

UNIV. OF
TORONTO
LIBRARY





Digitized by the Internet Archive
in 2010 with funding from
University of Toronto

Phys.

COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG.

5^{ME} VOLUME.

ÉDITION FRANÇAISE.



268 111.
26 / 5 / 32.

COPENHAGUE.

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP.

IMPRIMERIE DE THIELE.

1903.

TP
500
C35
V.5-6

TABLE DES MATIÈRES DU TOME CINQUIÈME.

Première livraison, 1900.

	Page
Johan Kjeldahl. Par W. Johannsen.....	1
Recherches sur le pouvoir rotatoire de quelques matières protéiques végétales. Par J. Kjeldahl.....	IX
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. Par Emil Chr. Hansen	1
X. La variation des <i>Saccharomyces</i> . (Avec 5 figures dans le texte).	1
1. Introduction.....	1
2. Aperçu de mes premières recherches et nouveaux contingents à ces études.....	3
Forme des cellules, p. 3. Formation des spores et bourgeonnement, p. 9. Actions chimiques. Variations de la levure de brasserie, p. 13.	
3. Nouvelles recherches sur les variétés asporogènes.....	18
Méthodes, p. 18. Expériences faites dans les liquides nutritifs, p. 21. Expériences faites sur un milieu nutritif solide, p. 24. Sélection ou transformation? p. 26. Sur les conditions de la transformation, p. 31.	
Recherches sur les bactéries acétifiantes. (Troisième mémoire). Par Emil Chr. Hansen (Avec 1 figure dans le texte).....	39
Limite de vitalité.....	39
De la variation	42
Phénomènes d'accroissement perforant et de formation anormale des conidies chez le <i>Dematium pullulans</i> , de Bary, et autres champignons. Par Alb. Klöcker et H. Schiønning. (Avec 6 figures dans le texte)...	47
La formation d'enzymes dans les ferments alcooliques peut-elle servir à caractériser l'espèce? Par Alb. Klöcker.....	58

Deuxième livraison, 1902.

Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. Par Emil Chr. Hansen	64
XI. La spore de <i>Saccharomyces</i> devenue sporange. (Avec 2 figures dans le texte).....	64
XII. Recherches comparatives sur les conditions de la croissance végétative et le développement des organes de reproduction des levures et des moisissures de la fermentation alcoolique. (Avec 4 figures dans le texte).....	68

111

	Page
1. Saccharomyces	68
Aperçu de mes recherches antérieures	68
Recherches nouvelles	74
Le bourgeonnement, p. 74. La formation de spores, p. 78. Sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation, p. 85.	
2. Levures alcooliques aux cellules ressemblant aux Saccharomyces	92
3. Oïdium lactis	95
4. Mucor	95
Dosage de petites quantités d'arsenic dans les matières organiques, spécialement dans la bière et dans le moût. Par Carl Pedersen.....	108
1. Introduction	108
2. L'appareil de Marsh	111
3. Méthodes d'oxydation	117
4. Méthode de précipitation d'après Reinsch	125
5. Méthode de distillation	129

Troisième livraison, 1903.

Études sur les enzymes protéolytiques de l'orge en germination (du malt)
par Fr. Weis:

I. Introduction	133
Historique de la question. Le Problème	133
II. Méthodes expérimentales	149
III. Lois générales de la protéolyse	165
1. Dépendance de la température	167
2. Dépendance de la quantité de ferment	180
3. Dépendance de la concentration de la solution de protéine..	184
4. Dépendance du temps	185
5. Dépendance du temps à des températures différentes	192
6. Dépendance du temps à des quantités de ferment différentes.	196
7. Dépendance du temps à des concentrations de protéine différentes	198
8. Dépendance de la présence de matières étrangères	203
IV. Nature et mode d'action des enzymes	227
1. Y a-t-il dans l'orge en germination plusieurs enzymes protéolytiques se laissant séparer ou préparer à l'état pur?	228
2. Propriétés chimiques et physiques	235
3. Influence sur des matières protéiques diverses. Points de ressemblance avec la pepsine et la trypsine animales	247
4. Les produits de dédoublement protéolytiques	256
V. Première apparition et formation des enzymes	274
1. Stade de germination	274
2. Proenzymes	279
VI. Conclusions	283

11



J. Kjeldsen.



JOHAN KJELDAHL.

L'Administration du laboratoire de Carlsberg m'a demandé de faire la biographie du chef de la section chimique du laboratoire, M. le professeur Johan Kjeldahl, décédé le 18 juillet 1900. Je tâcherai donc de donner un aperçu des travaux scientifiques de Kjeldahl et ensuite d'ajouter quelques mots sur sa personnalité sympathique et originale.

La réputation universelle de Kjeldahl est due a sa méthode de dosage de l'azote dans les substances organiques, publiée en 1883¹⁾ et appliquée maintenant dans tous les laboratoires où se font des analyses chimiques des substances animales et végétales. L'utilité de la méthode a été et est toujours d'une importance remarquable. Quiconque a connu par expérience les procédés de la méthode Will-Varrentrap, se souviendra avec reconnaissance de la facilitation énorme que marqua la méthode Kjeldahl, surtout pour l'analyse des liquides organiques. Que le dosage de l'azote fût peut-être la méthode quantitative de l'exécution la plus facile, a naturellement beaucoup favorisé l'étude de la transformation des matières azotées dans les organismes. Kjeldahl avait absolument raison en supposant que par sa méthode on pourrait traiter de telles questions jusqu'ici insuffisamment traitées à cause de la difficulté et la longue durée des méthodes antérieures d'autant plus inapplicables que les matières en question sont ordinairement de caractère changeant. Ce furent donc, avant toutes autres, les sciences physiologiques qui profitèrent de cette méthode; il va sans dire qu'elle

¹⁾ La méthode de dosage de Kjeldahl fut communiqué pour la première fois par une conférence à la Société chimique de Copenhague, le 7 mars 1883 et imprimée pour la première fois dans le *Zeitschrift für analytische Chemie* T. 22 p. 366 daté mars 1883; ensuite en forme plus détaillée au mois de juin de la même année dans le *Compte-Rendu du laboratoire de Carlsberg* T. 2, p. 1—27 (Résumé p. 1).

est inappréciable aussi pour les recherches chimiques agricoles et techniques, etc. En s'occupant d'études sur la transformation des matières protéiques pendant la germination de l'orge et la fermentation alcoolique, Kjeldahl sentit le besoin d'une telle méthode afin de se procurer d'abord un bon outil. Comme point de départ lui servirent les expériences faites par M. Wanklyn et d'autres chimistes anglais en traitant les substances organiques azotées avec de la potasse et de l'hypermanganate de potasse. Ces recherches ont montré que seulement une partie, même assez variante de l'azote des substances protéiques se transforme en ammoniacque, tandis que l'asparagine et quelques autres corps amidés dégagent de cette manière toute leur teneur en azote. Après quelques recherches infructueuses, Kjeldahl essaya de procéder à l'oxydation dans une solution acide, s'imaginant que l'ammoniacque aurait alors une plus grande tendance à se former. L'application d'acide atténué au lieu de potasse donna aussitôt un meilleur résultat. Un succès complet ne fut pourtant obtenu qu'à l'emploi d'acide sulfurique concentré chauffé jusqu'à une température voisine de celle du point d'ébullition et en ajoutant ensuite de l'hypermanganate sèche. Cette idée, bien proche comme toute idée géniale peut-être, survint comme un éclair; mais il resta encore un grand travail pénible: l'élaboration et le contrôle de la méthode. Kjeldahl mit également bien du temps à l'adaptation de la méthode iodométrique au dosage de l'ammoniacque formée pendant la décomposition; cette partie de la méthode est d'ailleurs une chose à part qui n'a pas trouvé d'application partout.

La méthode, telle qu'elle parut en sa forme originale, marqua un progrès énorme. Il se leva aussitôt, surtout dans des périodiques allemands, des discussions sur l'exactitude de la méthode, lesquelles amenèrent, avec les expériences ultérieures faites au laboratoire de Carlsberg, quelques petits perfectionnements dans la distillation et le dosage iodométrique¹⁾. Il faut remarquer que les chimistes allemands ont contribué au développement de la méthode, comme en ajoutant de l'oxyde cuprique à l'acide sulfurique, ce qui accélère et augmente son action sur la substance organique, de sorte qu'on peut souvent se passer tout à fait de l'hypermanganate. L'adaptation de la méthode aux nitrates ou aux composés nitriques est, comme on sait, une augmentation importante de la valeur nitrique de la méthode.

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 2, 323—329 (Résumé p. 193) et 2, 330—331 (Résumé p. 197), 1888.

En même temps que la méthode Kjeldahl est devenue un instrument précieux aux études chimico-physiologiques, elle a l'intérêt direct de prouver que les matières protéiques ne contiennent pas de groupes „azo-“, „nitro-“ et „nitroso-“.

Dans les recherches continuées de Kjeldahl, la méthode mentionnée a joué un rôle moins grand qu'il n'avait compté. Ses études sur les transformations des matières protéiques ne furent pas reprises quoiqu'il en projetât et qu'il exécutât de temps à autre des travaux préparatoires concernant surtout la présence et l'effet des diastases protéolytiques. Après s'être occupé, pendant les premières années de son séjour à Carlsberg, du dosage de l'alcool et des matières solides de la bière et du moût, surtout en vue des questions de contrôle techniques¹⁾, Kjeldahl passa bientôt à des recherches d'un intérêt plus scientifique. En 1879 et 1881 parurent ses recherches remarquables²⁾ sur les diastases hydrolysantes des hydrates de carbone, travaux considérés comme initiateurs à certains points, les recherches sur les conditions influant sur l'action des diastases ayant été, jusque là, rares et éparses. Kjeldahl traite d'une manière méthodique et exacte des questions de cet ordre surtout l'action de la température et de certains réactifs sur l'action des diastases. Il obtient par là des résultats très importants pour arriver à comprendre les lois générales de la dépendance de conditions externes de l'action de la diastase. Ses développements concernant le mesurage du pouvoir diastasique ont beaucoup contribué à l'éclaircissement de ces questions. La considération dont jouissent ces recherches se voit clairement en ce qu'on les cite encore toujours dans tous les bons ouvrages traitant les diastases, comme le nouveau manuel de M. Duclaux et surtout le traité de M. Bourquelot (*Ferments solubles*, 1896) si consciencieux au point de vue de bibliographie critique. — D'un autre côté, on s'étonne de la place bien modeste réservée aux recherches de Kjeldahl dans l'ouvrage récent de M. Oppenheimer: *Die Fermente und ihre Wirkungen*, avec ses listes de littérature surabondantes. Il s'y trouve cependant des inexactitudes qui auraient été évitées par une véritable connaissance des recherches de Kjeldahl.

Dans la première partie de ses mémoires sur les diastases, Kjeldahl rend compte aussi d'un perfectionnement de la modification faite

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 1, 1—39 (Résumé p. 12—21) 1878.

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 1, 107—184; 331—338 (Résumé p. 109 et p. 186).

par M. Reischauer du titrage du sucre de M. Fehling. Depuis, il a préféré la méthode plus exacte de peser le précipité cuprique.

L'étude des diastases mentionnées amena Kjeldahl à des recherches physiologiques sur la transformation des hydrates de carbone pendant la germination, ainsi qu'à des questions purement chimiques, telles que le dosage simultané des divers sucres.

En 1881, en même temps que ses „Etudes sur l'invertine“ parurent les Recherches sur les hydrates de carbone de l'orge et le malt spécialement au point de vue de la présence du sucre de canne¹). Outre la découverte d'une polysaccharide nouvelle, qu'on ne parvint cependant pas à isoler en état pur (l'Amylane, isolée presque en même temps par M. O'Sullivan) cet ouvrage contient ce renseignement important qu'il se forme pendant la germination de l'orge une grande quantité de sucre de canne, qui se dédouble ensuite en glycose et fructose. L'auteur y montre encore combien cette hydrolyse se fait facilement, si les organes en question sont triturés dans de l'eau, procédé analytique, comme on sait, très répandu il y a une vingtaine d'années. Il faut remarquer que c'est seulement par l'addition de substances détruisant les diastases ou qui en empêchent l'action qu'on obtient une analyse correspondante à la teneur réelle de la plante en substance hydrolysable. La trituration des matières végétales avec l'addition de carbonate de baryte en ajoutant de l'alcool concentré et chauffant ensuite est un procédé de grande importance qui paraît dater des recherches de Kjeldahl — du moins cette méthode y trouve un fondement réel. Il paraît cependant que ce mémoire est moins connu parmi les physiologistes qu'il mérite de l'être. Dans l'ouvrage en question, l'auteur cherche de même à faire le dosage simultané de divers sucres, problème dont il continua de s'occuper et qui en partie ont causé son mémoire dernier „Recherches sur l'action sur le sucre des solutions cuivriques alcalines“²). Dans cet ouvrage important, Kjeldahl indique chez les méthodes d'analyse reposant sur la réduction de la solution cuivrique, une cause d'erreur jusqu'ici inaperçue. Même après les améliorations de la méthode faites par M. Maercker, M. Allihn et d'autres, il fallut dire que la concordance des dosages exécutés par différents chimistes dans différents laboratoires laissaient beaucoup à désirer tandis que l'accord de deux dosages parallèles exécutés au même laboratoire s'établit d'une facilité frappante. Kjeldahl prouve clairement

¹) Carlsb. Lab. Medd. 1, 339—379 (Résumé p. 189).

²) Carlsb. Lab. Medd. 4, 1—62 (Résumé p. 1—19) 1895.

que les divergences mentionnées dependent de l'accès plus ou moins facile de l'oxygène au liquide pendant la réaction: c'est que la quantité d'oxydule cuprique précipité diminue (à l'accès de l'oxygène) au même degré qu'il est facile à l'oxygène de pénétrer. La réforme radicale de la méthode amenée par cette decouverte fut donc le chauffage du liquide en question dans un courant d'hydrogène. On obtient de cette manière beaucoup plus d'exactitude que par le procédé ordinaire. Il est évident que les tableaux faits auparavant par différents savants sur le rapport chez les divers sucres entre la quantité d'oxydule cuprique précipité et la quantité de sucre présent durent subir une revision, et Kjeldahl a également fait ce travail. On a contesté l'importance pour la pratique analytique de ces tableaux ayant trait seulement aux sucres purs, mais l'essence même de la chose: l'exclusion de l'oxygène du liquide cuivrique pendant la réaction, a été absolument confirmée et on doit à Kjeldahl l'honneur d'un progrès remarquable de l'analyse du sucre. La réaction mentionnée a d'ailleurs été l'objet de recherches spéciales de Kjeldahl. Il trouva, qu'en appliquant le liquide Soldaini à l'oxydation du glycose il se forme en grande quantité de l'acide més-oxaliquè. La continuation de ces recherches fournirait sans doute des renseignements bien intéressants.

Kjeldahl se livra avec un intérêt tout particulier à l'étude du pouvoir rotatoire des matières protéiques végétales et de leur solubilité dans de l'alcool de concentration différente. Il n'a publié sur ces matières qu'une communication donnée au congrès des naturalistes scandinaves en 1892, laquelle se trouve dans le présent livraison des Comptes rendus du laboratoire de Carlsberg. Citons comme exemple des résultats, que toutes préparations de matières protéiques qui, extraites à l'aide d'alcool à 55 p. c. et précipitées par un refroidissement à température très basse, peuvent être gagnées de la farine de froment, avaient pour ainsi dire à peu près la même teneur en azote (moy. 17,25 p. c.) et en carbone (env. 52 p. c.) et qu'elles avaient toutes, dissoutes dans de l'alcool à 55 p. c. un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = \div 92^\circ$. Ce nombre dernier se montra remarquablement constant même pour les préparations de blés de zones très différentes et de toutes les quatre années dont la récolte avait été analysée jusqu'à 1892. Il paraît ressortir de ce fait que la farine de froment ne renferme qu'une seule matière protéique soluble dans l'alcool, et non pas trois matières différentes comme était d'avis M. Ritthausen. Des recherches analogues donnèrent chez la matière protéique du seigle soluble dans l'alcool: $[\alpha]_D = \div 121^\circ$. Ici, Kjeldahl a commencé des recherches

d'un grand intérêt chimico-biologique qui contribueront à frayer le chemin à une caractéristique plus exacte des modifications spéciales des matières végétales les plus répandues.

Kjeldahl attribua un grand intérêt à ces recherches. On ne saura dire, si, en poursuivant ces études, il aura rencontré des difficultés particulières qui ont retardé la marche des recherches, il est toujours déplorable que huit ans se soient passées sans amener de plus amples publications.

Outre les travaux mentionnés plus haut qui, pour une partie, sont du même ordre, Kjeldahl a publié quelques petits mémoires: sur la neurine comme élément de la bière¹⁾, quelques remarques sur l'emploi de l'oxyde de mercure dans l'analyse élémentaire des substances organiques²⁾. Dans ce mémoire se trouve encore la description d'un ballon de décomposition perfectionné.

En regardant l'oeuvre de Kjeldahl, on y aperçoit partout une tendance au développement des méthodes exactes. Aussi la grande considération dont jouit Kjeldahl est-elle due à sa qualité de créateur de méthodes analytiques excellentes. Sa prédilection pour les procédés méthodiques correspond à son vif intérêt pour la physique dont il appréciait la méthodologie exacte.

Pendant sa jeunesse, il se livrait tout autant aux études physiques qu'aux études chimiques. Dans ses premières années à Carlsberg, il s'occupait encore de temps en temps d'études également méthodologiques de certaines questions concernant l'électricité; plus tard, il suivait avec grand intérêt le développement de la chimie physique moderne. Comme on le pense bien, l'indication de M. Hill que l'action de la maltase serait nettement réversible, l'intéressa vivement. Les recherches provisoires qu'il fit faire à cette occasion ne donnèrent qu'un résultat négatif, ce qui ne prouve cependant pas que M. Hill aurait tort. Il est vrai que les recherches de Kjeldahl sur l'amylase de malt lui donnèrent la conviction que même une accumulation considérable des produits de l'hydrolyse reste sans action sur l'action de la diastase en question. A juger de là, on citerait peut-être ces recherches en défaveur de celles de M. Hill. Malheureusement, nous regrettons la participation de Kjeldahl à l'étude de ces questions importantes, traitées, à ce qu'il paraît, souvent un peu légèrement par les adhérents comme par les adversaires de la manière de voir de M. Hill.

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 3, 79—87 (Résumé p. 67) 1891.

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 3, 110—121 (Résumé p. 98) 1891.

Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl, né le 16 août 1849, était fils de M. Kjeldahl, médecin à Jægerspris dans le Seeland du nord et de sa femme, née Lohmann. En 1867, il passa son baccalauréat au collège de Roskilde et en 1873, en achevant ses études à l'Ecole supérieure des arts et métiers à Copenhague, il y reçut la note supérieure. La même année il fut préparateur chez M. le professeur Barfoed au laboratoire chimique de l'Académie royale d'Agriculture de Copenhague en même temps qu'il assistait quelquefois aux expériences de M. Fjord. M. Barfoed présenta Kjeldahl à M. J.-C. Jacobsen, le fondateur du laboratoire de Carlsberg, lequel l'engagea comme chimiste dès le 1. mai 1875. Peu de temps après, à la création du Fonds de Carlsberg, l'administration du laboratoire passa à cette institution, et Kjeldahl fut nommé chef de la section chimique à partir du 1. octobre 1876. Son oeuvre pendant les 25 ans qu'il passa à Carlsberg a été mentionnée plus haut. Ajoutons ici qu'il lui était toujours un véritable plaisir de contribuer à ce que les jeunes gens qui lui étaient attachés pussent se perfectionner dans leurs études scientifiques ou techniques. Il leur accorda ainsi avec libéralité du temps pour des travaux personnels et les aidait de ses conseils de la manière la plus bienveillante. Des techniciens et des savants hors du personnel du laboratoire ont quelquefois travaillé sous la direction de Kjeldahl et ont joui de ses connaissances étendues.

En 1890, Kjeldahl fut élu membre de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark, en 1892 de l'Académie des Sciences de Christiania, la même année il reçut le titre de „Professor“. En 1894 il fut nommé docteur ès sciences honoraire à l'Université de Copenhague, et en 1898, il reçut la croix de chevalier de l'ordre du Danebrog.

Souffrant depuis quelques années d'une certaine dépression morale, sorte d'épuisement du cerveau sans doute, dont il paraissait presque rétabli après un séjour dans le Midi et en Norvège, Kjeldahl mourut subitement en se baignant à la plage de Tisvilde, en Seeland. Un coup de sang termina sa vie.

Depuis bien des années déjà, Kjeldahl souffrait de temps à autre d'une fatigue morale qui l'empêchait dans ces travaux scientifiques. Ce fut pendant de telles crises surtout qu'il regrettait, à côté de ses recherches au laboratoire, le bienfait stimulant qu'amène les devoirs d'un professeur chargé de cours réglés. Son esprit pétillant, son amour de l'art et de la littérature s'empara pour ainsi dire d'une partie de ses forces. Ajoutez à cela une santé un peu délicate, et l'on comprendra qu'il lui était impossible de poursuivre ses recherches

avec un zèle soutenu, imperturbable. C'était un homme de génie une nature riche, il ne fut jamais un travailleur proprement dit. Aussi ses travaux ne furent-ils pas considérables comme quantité, mais sa production était toujours de premier ordre.

Pour la science, le décès de Kjeldahl signifie donc la perte d'un talent supérieur et original, qui a rendu honneur à notre petite patrie; ses amis regrettent la perte d'une personnalité noble et distinguée. Kjeldahl était aimée de tous ceux qui eurent le bonheur de le connaître.

W. JOHANNSEN.

Recherches sur le pouvoir rotatoire de quelques matières protéiques végétales.

Par

J. Kjeldahl.

Communication présentée au Congrès des Naturalistes Scandinaves à
Copenhague 1892.

Les matières protéiques se transformant souvent très vite sous l'action de dissolvants acides et surtout alcaliques, il faut, pour gagner ces matières en un état non altéré, tâcher autant que possible d'employer des dissolvants neutres. Les matières protéiques végétales s'en laissent ordinairement peu influencer, sauf les globulines solubles dans de l'eau salée lesquelles sont généralement présentes en très petite quantité. Encore une exception est formée par les grains des divers blés contenant en grande quantité un certain groupe de matières protéiques: les matières protéiques du gluten, solubles dans de l'alcool dilué, insolubles dans l'alcool pur et dans l'eau et par conséquent facilement accessibles. Aussi ont elles été l'objet de recherches très nombreuses, parmi lesquelles celles de M. Ritthausen (*Die Eiweisskörper der Getreidearten und der Oelsamen* 1872) ont été particulièrement détaillées et ont préalablement terminé les traitements de ce sujet.

La caractérisation de l'individualité chimique des matières protéiques compte parmi les problèmes difficiles à résoudre. Les rapports de solubilité et les qualités physiques n'offrent aucun point d'appui fixe. Leur composition élémentaire n'est pas non plus toujours décisive, à cause du peu de différence qui se trouve à cet égard entre les matières protéiques en tout. En examinant les chiffres de M. Ritthausen, on trouve souvent plus de divergence entre les différentes analyses de la même substance qu'entre les analyses de matières prétendues diverses. La nature et les proportions quantitatives des produits obtenus de la décomposition par ébullition en présence d'acide dilué servent souvent

d'indication, mais la séparation quantitative de ces produits ne se laisse pas accomplir à cause de leur solubilité facile.

Un critérium assez utile, jusqu'ici apparemment peu employé à la caractérisation de ces matières est fourni par le pouvoir rotatoire optique. Les matières protéiques du gluten, comme toutes les matières protéiques, faisant tourner la lumière polarisée fortement à gauche, et l'indice $[\alpha]_D$ étant très variable mêmes chez des substances d'ailleurs parentes, il serait à espérer qu'on y trouverait un moyen de faire des séparations dans ce groupe.

Mes recherches ont particulièrement regardé la farine de froment qui contient la plus grande quantité des substances mentionnées et qui, par M. Ritthausen et d'autres, ont été le plus spécialement traitée. J'ai trouvé que la quantité des matières protéiques extraite par l'alcool dilué dépend entièrement de la concentration de cet alcool. Si l'on marque les résultats obtenus sur un schème graphique dont les abscisses indiquent la concentration de l'alcool (0 à 100 p. c.) et les ordonnées l'azote dissous (en p. c. d'azote total) la courbe montrera un minimum à 20 p. c. d'alcool, un maximum à 55 p. c., tandis qu'à 90 p. c. elle se rapprochera à la ligne des abscisses. Au contraire, la quantité d'azote dissous ne dépend que peu de la quantité d'alcool employée, de la durée de l'action et même de la température. En tout cas, l'alcool à 55 p. c. bouillant n'en extrait guère plus de la farine fine que l'alcool de température ordinaire. Des extractions ne furent donc exécutées qu'avec de l'alcool à 55 p. c. de température ordinaire. Presque toujours, la matière protéique fut gagnée par refroidissement de cette solution au moyen d'un mélange réfrigérant. La substance fut plusieurs fois dissoute et ensuite encore précipitée par refroidissement. Enfin la matière protéique fut précipité par de l'alcool absolu en grande quantité, traitée avec de l'éther et séchée dans le vide. Une précipitation fractionnée eut lieu par refroidissement à des températures décroissantes limitées, par ex. de 16° — 5° , de 5° — 0° , de 0° — $\div 10^{\circ}$, une seule fois par distillation fractionnée de l'alcool.

Sauf quelques rares exceptions, toutes les préparations continrent 17,25 p. c. Az et environ 52 p. c. C et posséderent, dissoutes dans de l'alcool à 55 p. c. un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = \div 92^{\circ}$. Ce nombre est remarquablement stable, de sorte qu'on ne le trouve pas seulement chez toutes les fractions mentionnées, mais aussi chez toutes les préparations gagnées des échantillons du froment venu des zones les plus différentes (de Danube, de Californie, de Danemark) et provenant des quatre années dont j'ai eu jusqu'ici l'occasion d'analyser les récoltes.

Ceci surtout paraît indiquer que le froment ne renferme qu'une seule matière protéique soluble dans l'alcool, tandis que M. Ritthausen, comme on sait, en suppose la présence de trois (fibrine, gliadine, mucédine).

La rotation optique de cette matière protéique dissoute dans l'acide acétique dépend essentiellement de la concentration de l'acide. Une dissolution par l'acide glaciale montre $[\alpha]_D = \div 81^\circ$, par l'acide acétique très dilué (de 5 p. c. descendant jusqu'à 1 p. m.) on trouve $[\alpha]_D = \div 111$. Chez les solutions dans des alcaliques fort dilués $[\alpha]_D$ paraît avoir la même valeur que dans les solutions d'acide atténué. En appliquant du phénol, $[\alpha]_D$ se trouve env. $\div 130^\circ$ à une température de 40 degrés.

Chez la farine de seigle, la courbe de solubilité présente le même aspect que chez la farine de froment. Ici, l'alcool à 55 p. c. dissout de même un peu plus que la moitié de l'azote. La glutine de seigle s'isole facilement en état pur, et le rendement en est considérable. On trouve ici chez les solutions dans l'alcool à 55 p. c. $[\alpha]_D = \div 121^\circ$, dans des acides dilués (acide acétique ou acide chlorydrique) $[\alpha]_D = \div 144^\circ$, dans l'acide glacial $[\alpha]_D = \div 105^\circ$ dans le phénol, à la température de 40° , $[\alpha]_D = \div 157^\circ$. Az = 17,20 p. c. C = 53,6 p. c.

La courbe de solubilité de la farine d'orge est identique aux précédentes; la quantité d'azote soluble dans l'alcool à 55 p. c. ne fait ici que la moitié de la substance entière. Az = 16,52 p. c. C = 53,0.

$[\alpha]_D = \div 111^\circ$ dans l'alcool à 55 p. c.

„ = $\div 130^\circ$ dans l'acide acétique dilué.

„ = $\div 149^\circ$ dans le phénol.

La valeur d' $[\alpha]_D$ est bien moins stable que celle des blés mentionnés.

La farine d'avoine rend le plus de glutine à l'alcool à 60 p. c., relativement peu du reste et la glutine passe facilement à un état insoluble. Les solutions vineuses ne se laissaient pas jusqu'ici gagner assez limpides pour faire la polarisation. Dans l'acide acétique dilué et dans la soude on trouvait $[\alpha]_D = \div 83^\circ$ (?).

La courbe de solubilité de la farine de maïs diffère complètement des précédentes en ce qu'il a son maximum à 40—50 p. c. d'alcool, tandis que son minimum se trouve à 75—85 p. c. Aussi la matière protéique ne peut pas être gagné par refroidissement mais seulement par précipitation avec de l'eau. Dans l'alcool à 75 p. c. $[\alpha]_D = \div 35^\circ$, dans l'acide glacial = $\div 28^\circ$; dans l'acide acétique dilué, cette matière protéique n'est pas soluble en liqueur limpide.

L'addition de sels aux dissolvants est d'action différente. Les solu-

tions dans l'acide acétique atténué sont précipités quantitativement par l'addition d'un peu de sel gemme. Une très petite quantité de ce sel (et d'autres sels) produit une diminution de l'indice $[\alpha]_D$ (la glutine de seigle par ex. dans l'acide acétique dilué seul donne $[\alpha]_D = \div 144^\circ$, avec 0,1 p. c. NaCl = $\div 136^\circ$, avec 0,2 p. c. = $\div 128^\circ$).

L'addition de sels à l'alcool dilué produit un effet contraire: L'alcool à 55 p. c. saturé avec du sel marin (9 p. c.) et surtout saturé à demi avec de la chlorure de calcium (env. 16 p. c.) a bien plus de pouvoir dissolvant que l'alcool pur, tandis que le pouvoir rotatoire de cette sorte de solutions paraît dépasser un peu le degré de rotation normal. Ainsi, la glutine de froment donna, dans de l'alcool à 55 saturé avec du sel commun: $[\alpha]_D = \div 95^\circ$ (au lieu de $\div 92^\circ$). De cette manière, se dissolvent bien des matières protéiques autrement insolubles dans de l'alcool dilué par ex. la conglutine, la légumine de pois et la caséine de lait de vache.

Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques

Par

Emil Chr. Hansen.

X.

La variation des Saccharomyces.

1. Introduction.

Durant ces dernières années, les microorganismes se sont presque fait une mauvaise réputation de variabilité; toutefois, en y regardant de près, on les trouve à peine plus variables que les végétaux supérieurs; mais leurs générations se produisent avec beaucoup plus de rapidité et, par suite, les phénomènes de variation apparaissent aussi plus vite. Ici l'expérimentateur peut être témoin de transformations remarquables en peu de temps. En pratique il y a plus, car les microorganismes nous suscitent par leur variation plus de difficultés que les plantes supérieures. Voulons-nous définir tel ou tel microorganisme, il nous faut à propos de chaque caractère faire un essai spécial de culture et ne demander qu'à la somme des caractères ainsi obtenus les renseignements sur l'espèce en face de laquelle nous sommes. Ici nous n'avons pas l'habitus comme point de ralliement, et la voie qui nous est prescrite est conséquemment longue et pénible.

C'est le contraire chez les Phanérogames: leur floraison nous révèle d'un seul coup les caractères les plus importants. Il est vrai qu'on y trouve aussi des variations: ainsi la même plante peut présenter des branches à feuilles éparses ou opposées, ainsi que de grandes variations dans la configuration du limbe, et l'on peut constater, pour les organes floraux, de grandes oscillations à l'égard du nombre, des dimensions, de la couleur et de la forme; mais s'il nous manque quelqu'un des caractères essentiels, nous pouvons aussitôt trouver dans les autres un point de repère, sans être forcés à leur appliquer l'appel individuel dans des expériences souvent longues, comme dans le cas des

microorganismes. Quant au sens, les variations sont essentiellement identiques chez les Phanérogames et chez les Cryptogames.

En expérimentant assez longtemps sur les diverses levures, on observe inévitablement toute une série de variations différentes. Presque tous mes traités appartenant à la présente série viennent à l'appui de cette assertion, depuis le premier, paru en 1881, jusqu'au présent.

Jusqu'en 1889, nombre de mes recherches portaient sur l'étude des *Saccharomyces*, admis que chez eux, comme chez d'autres organismes, il se produit des unités systématiques ayant des caractères constants. Puis mes études expérimentales de la variation sont arrivées de plus en plus au premier plan, et ce sont leurs résultats que j'ai publiés successivement dans les communications suivantes :

Ueber die in dem Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. V, 664 (1889)).

Production de variétés chez les *Saccharomyces*. (Ann. de Micrographie II, 214 (1890)).

Experimental studies on the variation of yeast-cells. (Ann. of Botany. IX, 549 (1895)).

Enfin, deux conférences faites aux assemblées des brasseurs tenues en 1896 à Copenhague (Forhandlingerne paa det tredie danske Bryggerimøde) et en 1897 à Stockholm (Svenska Bryggarefören. Månadsblad).

Mes recherches sur les sujets en question se trouvent donc disséminées dans diverses publications et, comme elles couvrent un laps de temps considérable, les observations et les résultats qui devraient figurer ensemble, sont séparés. Dans le paragraphe suivant je me propose de donner un résumé succinct de ces travaux et de réunir les éléments concordants; j'y joins en outre de nouvelles recherches que j'ai eu l'occasion de faire depuis les dernières publications. Dans la plupart des points ce sera plus que la somme des résultats de mes recherches sur ce terrain: ce sera la conclusion. Les recherches du paragraphe en question comprennent les questions suivantes: forme des cellules, formation des spores et bourgeonnement, ainsi que les actions chimiques et enfin la variation de la levure de brasserie. Quand les recherches susdites se trouvent dans le „Compte rendu du Laboratoire de Carlsberg“, ce périodique est cité; mais, s'agit-il des communications provisoires dont on a parlé plus haut, on se contente d'en indiquer la date entre parenthèses.

Le troisième paragraphe communique mes nouvelles recherches sur les variétés sans spores. La fin de mes recherches sur la variation sera ultérieurement communiquée dans un ou deux nouveaux

mémoires. MM. Nielsen, Klöcker et Schiønning, attachés au Laboratoire, m'ont prêté leur concours pour faire les analyses.

2. Aperçu de mes premières recherches et nouveaux contingents à ces études.

Forme des cellules.

Le point de départ des recherches sur la variation doit naturellement être une culture absolument pure, basée sur une cellule unique. Toutefois, même dans une pareille culture, le microscope révèle immédiatement à l'observateur la diversité des individus. Telle cellule ne ressemble pas à telle autre. On peut même en dire autant des espèces qui, comme le *Saccharomyces cerevisiæ* I, présentent les individus les plus uniformes. Le type de la cellule du *Saccharomyces* peut se modifier depuis la forme de sphère parfaite jusqu'à celle de l'ovale, jusqu'à la forme d'un œuf plus ou moins en pointe, d'un boudin allongé ou d'un simulacre de bactérie. La cellule peut se ramifier et affecter les formes les plus baroques. Ces formes peuvent prendre différentes dimensions et se retrouvent dans toutes les espèces; chaque individu peut fonder une végétation, composée de tous les types susdits. (Touchant l'importance de ces observations pour la description des espèces, voir *Compte rendu du Laborat. Carlsberg* II, pp. 37 et 44 (1883)).

Dans le mémoire cité, j'ai également fait ressortir la variation au point de vue des formes, dimensions et nombre des spores dans la cellule mère. Hormis les espèces comme le *Sacch. anomalus*, dont les spores sont en forme de chapeau ou d'hémisphère, les espèces figurent en général à spores sphériques; c'est là la forme typique; mais il n'est pas rare qu'elle passe à celle de rognon ou d'œuf; le *Sacch. membranæfaciens* est bien l'espèce qui présente la plus grande variation dans les sens précités.

Les cellules de certaines espèces ont plus de tendance que d'autres à prendre les formes allongées; c'est ce qu'on peut affirmer en particulier du groupe *Sacch. Pastorianus*. Au début de l'évolution, ce sont généralement les cellules rondes, les ovales et les grandes qui prédominent, tandis que les phases ultérieures abondent surtout en cellules allongées et en petites. Chez le *Sacch. apiculatus* j'ai observé (*Compte rendu du Laborat. Carlsberg* I, 172 (1881)) que les cellules citriformes se produisent surtout au commencement du bourgeonnement, et prennent alors le dessus. Dans les cultures à l'eau et à la gélatine qui ont vieilli, il n'est pas rare de trouver de petites cellules ressemblant à des bactéries, ainsi que des cellules d'un

type différent et anormal. On constate ces faits, non seulement chez cette levure, mais encore dans d'autres espèces.

Comme on peut s'y attendre, les spores affaiblies ou celles qui germent dans des conditions alimentaires difficiles, ne donnent non plus que des cellules généralement petites. En pareils cas il se peut qu'on ait des végétations tout à fait différentes des normales. Quant à la variation due à la fusion des spores, voir les figures du Compte rendu du Laborat. Carlsberg III, 48 et suiv. (1891).

La grande différence entre les cellules ordinaires de levure de dépôt données par une espèce et ses cellules de voiles, se constate dans les figures insérées à ce Compte rendu de 1886. Dans les vieux voiles résultant d'une longue culture en ballons chargés de mût,

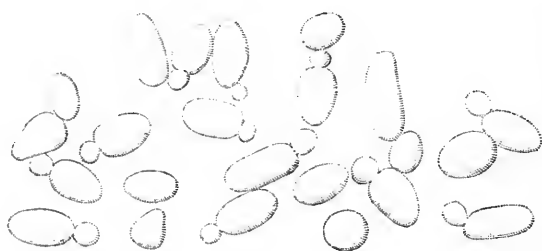


Fig 1. *Sacch. Marxianus*.

Levure de dépôt d'une culture d'un jour dans le mût de bière à env. 25° C.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

la formation de colonies à cellules allongées devient très apparente. Cela est vrai de toutes les espèces, même de celles qui, comme le *Sacch. cerevisiæ* l, se distinguent, à leurs premières phases d'évolution, par la formation de cellules rondes et ovales. Les *Saccharomyces* peuvent également présenter, dans les cultures sur gélatines nourricières, des colonies à cellules allongées, ce qui leur donne fréquemment l'aspect du *Monilia candida* (Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 154, fig. 6 (1888)) et celui de certains degrés d'évolution des *Dematium*, *Chalara* et *Oïdium*. Les *Sacch. Marxianus*, *Sacch. membranæfaciens* et *Sacch. Ludwigii* appartiennent aux espèces qui ont une propension à cette formation. J'en ai donné une description dans le Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 145 et suiv. (1888) et dans le mémoire précité de 1889. Les illustrations suivantes sont nouvelles. La fig. 1 montre une jeune végétation du *Sacch. Marxianus* provenant d'une culture en mût. En la semant dans la gélatine d'eau de levure, on obtint une végétation comme celle de la fig. 2. Une pareille évolution eût également lieu sur gélatine de bière basse de garde. Les deux figures

susdites résultent de photographies prises par M. Schiönning. La formation mycélienne chez le *Sacch. Ludwigii* dans les vieilles cultures se voit en fig. 3. Même dans la germination des vieilles



Fig. 2. *Sacch. Marxianus*.

Végétation dans la gélatine d'eau de levure. Culture en chambre Böttcher, sous ventilation abondante; température ordinaire. Grossissement linéaire de 1000 fois.

spores, on peut avoir des formations mycéliennes à cloisons transversales (voir mon illustration dans le *Compte rendu du Laborat. Carlsberg III*, 56 (1891)). Si l'on transporte dans du moût ces

végétations ressemblant à des Moisissures, il s'y développe des cellules qui peu à peu retournent au point de départ.

En général il subsiste une certaine relation numérique entre les

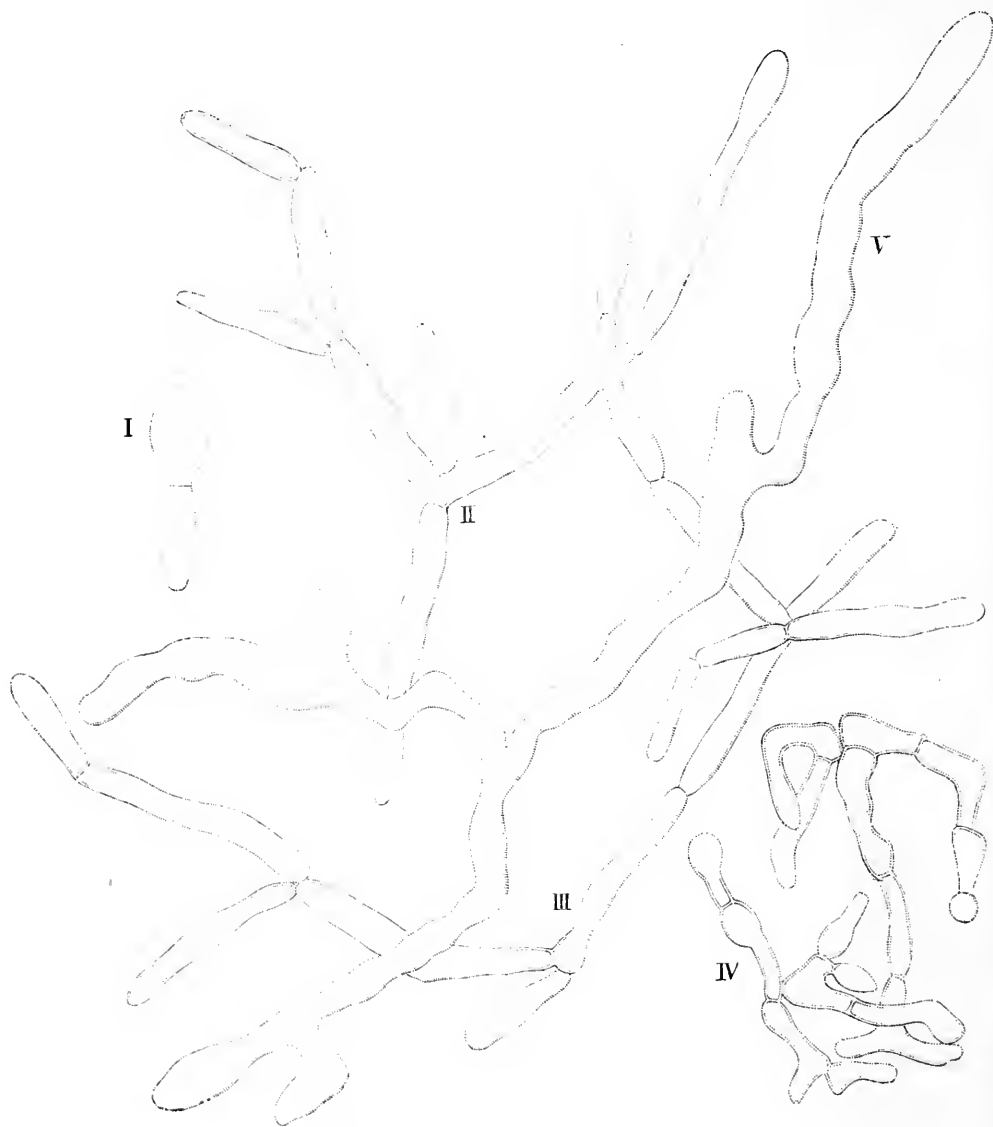


Fig. 3. *Sacch. Ludwigii*.

Formation mycélienne provenant de vieilles cultures dans du jus de cerises et dans l'eau de levure. I. Cellule de levure qui a poussé un bourgeon en boudin, séparé de la cellule mère par une cloison transversale. II—IV. Mycélium ramifié à cloisons transversales très développées. V. Cellule mycélienne à ramifications, mais sans cloison transversale. Grossissement linéaire de 1000 fois.

cellules ovales d'une espèce et celles en forme de boudin; chez les espèces appartenant aux groupes *Sacch. cerevisiæ* et *Sacch. ellipsoideus*, ce sont, comme on le sait, les ovales qui prédominent, tandis que les boudins ont le dessus dans les espèces du groupe

Sacch. Pastorianus. C'est là la règle, mais on n'en constate pas moins, en certains cas, que tel type déterminé peut persister à paraître durant plusieurs générations et plus fortement qu'à l'ordinaire, en sorte que les végétations nouvellement formées en reçoivent un cachet complètement étranger. C'est un cas de ce genre que j'ai décrit dans mes Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation (Compte rendu du Laborat. Carlsberg II, 189 (1888)).

Les expériences auxquelles je fais allusion, ont été commencées avec de la levure basse n° 1 de Carlsberg et plus tard continuées avec d'autres espèces de levure basse de brasserie. En isolant les cellules dans une seule et même culture pure, j'ai constaté que j'obtenais deux catégories de végétations ayant chacune son type cellulaire saillant: dans l'une c'étaient les cellules ovales qui prédominaient, dans l'autre

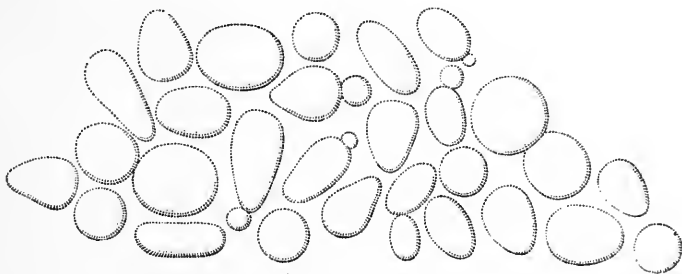


Fig. 4. Levure basse n° 1 de Carlsberg.

Levure de dépôt d'un jour en moût de bière à env. 25° C. Grossissement linéaire de 1000 fois.

celles en boudin. Cette dernière végétation avait donc un aspect tout à fait différent de celui qu'on trouve ordinairement à une végétation normale de l'espèce mentionnée. Ici, l'évolution avait suivi une ligne décidément anormale, qui se maintint durant plusieurs cultures en moût; dans un cas, il se passa même près de deux mois avant que les cellules normales eussent repris le dessus sur celles en boudin. Le type sans spores que j'ai récemment obtenu par la culture, mentionnée plus loin, du *Sacch. Pastorianus* II sur gélatine de moût à 25° C., s'est comporté d'une manière analogue; car les végétations qu'il émit dans les cultures en moût, ressemblaient, les unes à celles du groupe *Sacch. ellipsoideus*, les autres à celles du groupe *Sacch. Pastorianus*, et cette différence a persisté à travers un grand nombre de cultures, aussi bien à la température ordinaire qu'à 25° C.

J'ai montré par un exemple l'influence de la température sur la forme des cellules de levure basse de la bière, dans le Compte rendu

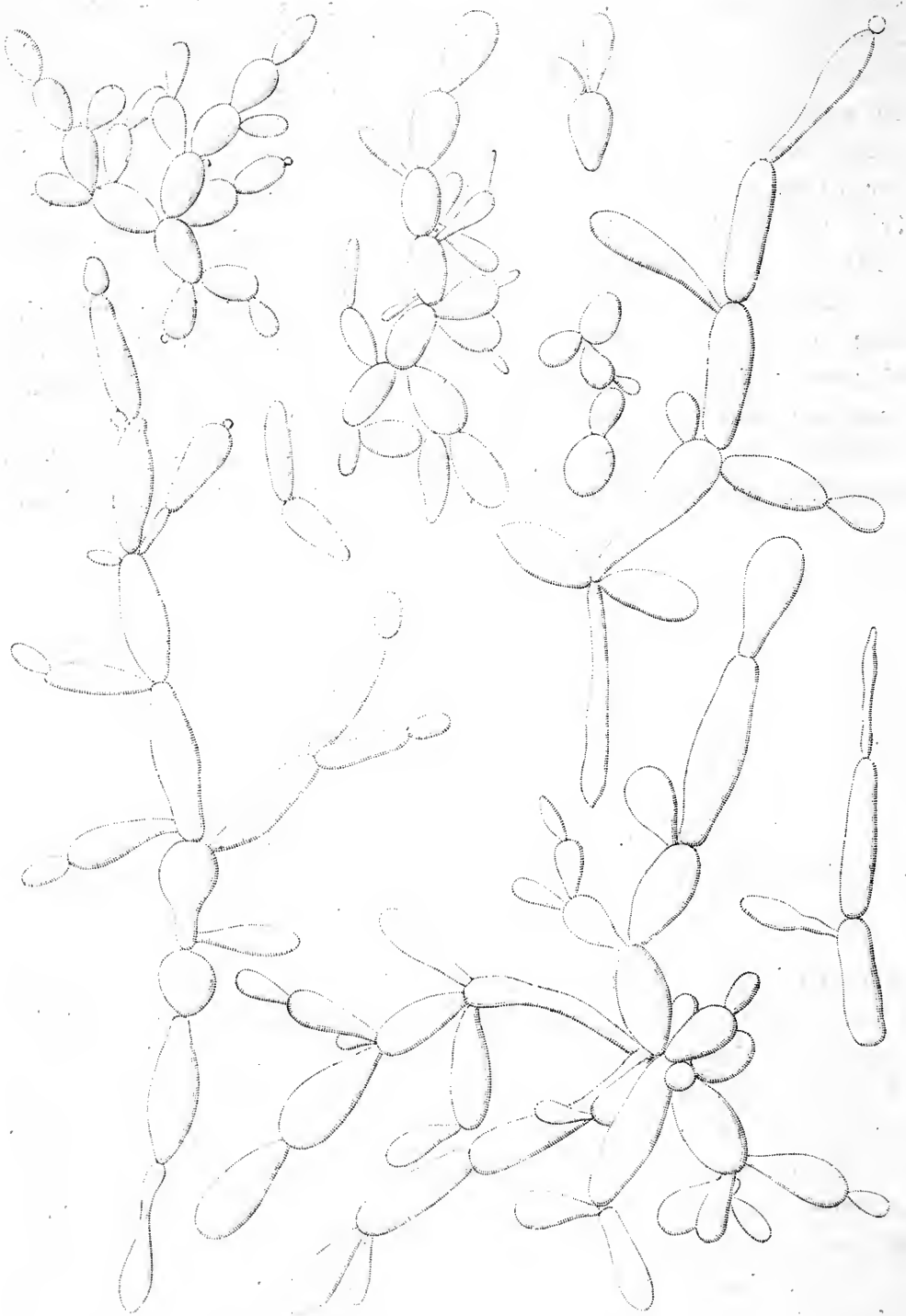


Fig. 5. Levure basse n° 1 de Carlsberg.

Végétation en culture en moût à $7^{\circ} \frac{1}{2}$ C., après ensemencement avec des cellules d'une culture en solution de saccharose qui avait séjourné un an à la température ordinaire. Grossissement linéaire de 1000 fois.

du Laboratoire de 1883, p. 42. On a constaté que, cultivées dans le moût à 27° et à $7^{\circ} \frac{1}{2}$ C., des végétations qui avaient séjourné

pendant un an dans une solution de saccharose et dans le moût, donnaient de nouvelles végétations ayant un tout autre aspect: à 27° elles étaient généralement normales, mais à la basse température elles apparaissaient en général comme cellules allongées et colonies enchevêtrées, ressemblant à du mycélium. Plus tard, opérant sur des végétations analogues, mais un peu plus vieilles, de levure basse n° 1 de Carlsberg, j'ai obtenu au fond le même résultat. Ce qui caractérise les végétations nouvellement formées aux deux températures susdites, c'est qu'à la température inférieure les colonies évoluées sont ordinairement très ramifiées et que souvent leurs cellules sont fort allongées, tandis qu'à la température supérieure les colonies ont surtout des cellules ovales. La variation se révèle par la comparaison des figures 4 et 5, qui montrent respectivement une jeune végétation normale d'une culture en moût, et la susdite formation de colonies à 7° 1/2 C.

Toutes ces expériences ont fait constater que des cellules provenant d'une même végétation et développées dans les mêmes conditions, n'en sont pas moins aptes à donner des colonies de valeurs différentes et, par suite, à constituer diverses séries d'évolutions capables de conserver leur cachet particulier durant un certain temps. Ainsi, ce n'est point toutes les cellules qui, à basse température, développent les susdites colonies ressemblant au mycélium. Ce qu'on peut dire de tous les types anormaux ci-dessus décrits, c'est qu'après une série plus ou moins longue de cultures en moût ils reviennent à l'état normal. On doit également placer ici les recherches de Will sur la formation des voiles dans quelques espèces de levure basse de brasserie; voir la Zeitschr. f. das ges. Brauwesen, 1895.

Formation des spores et bourgeonnement.

Dans mon mémoire cité plus haut et inséré au Compte rendu du Laboratoire 1883, on trouve des renseignements sur la variation en question, non seulement en ce qui concerne la forme et les dimensions des spores, mais encore à l'égard de leur évolution. L'observation me révéla alors que les cellules du Sacch. Pastorianus I, engendrées à 27° C. dans une culture en moût ayant deux jours, avaient moins de tendance à donner des spores que les cellules de cultures d'un jour. Plus tard, l'expérience a montré que cette différence est manifeste surtout quand les cellules comparées proviennent de cultures vieilles d'un jour et de sept.

Mes diverses communications sur la levure basse n° 1 de Carlsberg font voir que nous avons ici une forme donnant extrêmement peu ou point de spores: durant la longue suite d'années pendant

laquelle cette espèce a été soumise à des recherches, elle s'est maintenue dans le susdit état, et n'a présenté que de petites oscillations. On peut en obtenir des cultures pures dont les cellules peuvent traverser de très nombreuses générations et un laps de temps fort long sans donner de spores; c'est cette forme qui pour la première fois a appelé mon attention sur la propriété qu'ont les *Saccharomyces* de perdre leur faculté de développer des spores. Elle fournit donc un nouvel exemple de l'état de choses dans lequel des individus appartenant à une même végétation et descendant, au début, de la même culture d'une cellule unique, n'en peuvent pas moins fonder différentes variétés douées d'une grande constance. Ce point est devenu plus saillant, d'une manière encore plus manifeste, par mes recherches sur le *Sacch. Ludwigii* (1889), qui montrent qu'après avoir passé quelque temps dans son milieu nutritif, cette espèce peut développer des cellules privées du pouvoir de former les susdits corps de reproduction. En isolant un assez grand nombre de cellules, j'ai obtenu trois types de végétations, dont un se distinguait par l'énergie de sa faculté de produire des spores, tandis que ce même pouvoir allait s'éteignant dans le second, et ne se manifestait nullement chez le troisième. Une culture en moût vit cette dernière végétation persister à ne donner aucune spore durant de très nombreuses générations; elle dut séjourner longtemps dans ce liquide pour que la propriété de produire des spores reparût; encore était-ce peu de chose. Au contraire, cette réapparition se manifesta promptement quand on fit la culture dans du moût additionné d'un peu de dextrose. Plus tard M. Klöcker a trouvé que le *Sacch. Marxianus* donne quelque chose d'analogue, mais de nouvelles expériences m'ont appris que ce ne sont pas toutes les variétés asporogènes du *Sacch. Ludwigii* qui réagissent de la manière décrite en présence de la dextrose. Cela nous donne un exemple d'une variation qui suscite des formes encore plus constantes que les précitées. Mes expériences ultérieures ont établi que, dans les circonstances mentionnées, d'autres espèces peuvent, elles aussi, donner des variétés asporogènes et se maintenant constantes à travers nombre de générations. Je l'ai constaté aussi bien dans les vieilles cultures en moût que dans les nouvelles, à la température ordinaire, quand il s'agit des *Sacch. cerevisiæ* I, *Sacch. Pastorianus* I, *Sacch. Pastorianus* II, *Sacch. Pastorianus* III, *Sacch. ellipsoideus* I et quelques espèces de levure basse de bière non encore décrites. En certains cas, ces cultures étaient exposées à la lumière; en d'autres, elles étaient tenues à l'obscurité; la distribution de la lumière semble donc n'avoir aucune influence: en somme, nous n'en savons pas davantage sur les conditions dans lesquelles la variation s'est produite

ici. On peut en dire autant de la variation correspondante qu'on retrouve en plusieurs espèces cultivées sur gélatine au moût. Durant ces dernières années, MM. Boullanger, P. Lindner et Beijerinck ont fait des observations analogues.

Dans le susdit mémoire de 1889, j'ai également parlé des expériences où pour la première fois j'ai réussi à produire des variétés constantes. C'est alors, en effet, que j'ai découvert la perte complète subie par la végétation des *Saccharomyces* de produire des spores lorsque, à travers de nombreuses générations, on continue à les cultiver en moût à une température voisine du maximum du bourgeonnement. En poursuivant ces expériences, je me suis convaincu qu'il y a là une loi valide pour tous les *Saccharomyces* typiques, soit espèces de levure de culture, soit espèces de levure sauvage. Les seules qui semblent y faire exception, sont les espèces à part: le *Sacch. membranæfaciens*, le *Sacch. anomalus* et le *Sacch. Ludwigii*; mais il faut bien dire aussi, comme je l'ai fait ressortir ailleurs, que ces types diffèrent des espèces de *Saccharomyces* proprement dites, au point qu'on peut les donner comme types de nouveaux genres. Comme on le verra au paragraphe suivant, le *Sacch. anomalus* a donné, par un autre procédé, une variété constante dépourvue de spores.

Elle aussi, la fonction du bourgeonnement subit, comme on pouvait s'y attendre, l'influence du traitement radical qui atteint les cellules durant les susdites expériences de variation à hautes températures. Chez certaines variétés asporogènes j'ai constaté que, dans les cultures en moût, les cellules faisaient preuve d'un plus grand pouvoir de multiplication que leur type primitif, et qu'en plusieurs cas leurs végétations sur gélatine nourricière avaient un tout autre aspect que ce type. Les premières variétés sans spores que j'ai produites à la suite de la culture susdite dans des liquides à haute température, étaient toutes sans voiles, et se sont montrées aussi constantes sous ce rapport que sous le premier. Toutefois, durant ces dernières années, j'ai noté, de temps à autre, des variétés sans spores et en tout cas douées d'une grande constance, mais qui néanmoins formaient des voiles. Je les ai observées dans toutes les conditions de culture où la variation susdite a été constatée; mais le nombre était petit, et c'était pure exception. Néanmoins, dans quelques-unes de ces cultures, on a constaté que certaines cellules avaient la faculté latente et très faible de produire des spores; car au bout d'un ou de deux ans de culture, elles avaient récupéré le pouvoir de former les susdits corps de reproduction, bien que le plus souvent à un faible degré seulement. Je ne regarde donc pas comme

invraisemblable que ces variétés asporogènes qui produisent des voiles, reviendront toutes à l'état normal et que, par conséquent, elles diffèrent des autres pour la valeur. Je les ai observées dans le *Sacch. cerevisiæ* I, le *Sacch. Pastorianus* II, le *Johannisberg* II et la levure de distillerie dite *Rasse* II de Lindner. Or, quelle que soit l'explication de ce qui se passe, le fait général est que la perte du pouvoir de donner des spores et la perte de celui de former des voiles ont lieu ensemble durant le traitement décrit.

Au moment où paraît ce mémoire, les plus anciennes de mes variétés sans spores vont dater de douze ans; nombre d'entre elles remontent à trois ans et plus. Bien que durant cette longue période de temps elles aient été cultivées dans les conditions les plus diverses, elles n'ont rien perdu en constance: ces vieilles cultures n'ont redonné ni spores ni voiles.

Dans le *Compte rendu du Laborat. Carlsberg* II, 119 (1886) j'ai mentionné la variation frappante constatée dans la manière dont la levure de dépôt se peut comporter dans les cultures en moût. La plupart des espèces présentent généralement cette levure sous une apparence pâteuse; mais parfois elle paraît disposée en couches membraneuses et plissées, ou bien l'aspect est caséux; souvent il y a des fragments noueux et creux. Dans ces cas-là, il se forme, pendant le bourgeonnement, des colonies fortement ramifiées dont les cellules ne se séparent pas les unes des autres, et le liquide se maintient d'un blanc éclatant, même après que la fermentation est en pleine activité. J'ai observé ce phénomène dans mes trois espèces du groupe *Sacch. Pastorianus*, quand je pris la semence dans de vieilles cultures en solution de saccharose ou en moût. Ce qui précède était publié quand je remarquai qu'après être restées desséchées pendant un certain temps, ces espèces, aussi bien que la levure basse n° 2 de Carlsberg et *Johannisberg* II, pouvaient également développer dans le moût de la levure caséuse. Ces cas ont tous cela de commun que les cellules de la semence sont plus ou moins affaiblies. Cependant l'évolution anormale qu'on a décrite, ne se produit pas toujours dans les circonstances indiquées; les facteurs qui en décident, nous sont inconnues. Parfois elle traverse une longue série de cultures; souvent elle est promptement remplacée par le type commun de la levure pâteuse. On retrouve cette même fugacité et cette même irrégularité de caractère dans la variation qui consiste en ce que la levure basse peut présenter, durant un certain temps, les phénomènes constatés en cas de levure haute, et inversement.

Actions chimiques. Variations de la levure de brasserie.

Dans la communication de 1895 citée plus haut, j'ai mentionné quelques recherches qui visent à obtenir des variétés donnant lieu à plus ou moins d'alcool que leurs types primitifs. En cultivant deux variétés de levure basse n° 1 de Carlsberg en deux séries, l'une en moût ordinaire, l'autre à la surface de la gélatine au moût, et renouvelant fréquemment ces cultures, j'ai constaté qu'au bout de quelques mois il s'était produit, sur la gélatine au moût, des variétés qui surpassaient, en pouvoir fermentaire vis-à-vis de la production de l'alcool, les types dont elles provenaient et qui avaient été constamment cultivés dans le moût. Dans le moût de bière additionné de 25 p. c. de sucre de canne et à la température ordinaire, les types primitifs produisirent environ 13 vol. p. c. d'alcool, tandis que les variétés nouvelles en donnèrent 13,6. Une différence encore plus grande et dans le même sens s'est manifestée dans quelques expériences que je fis avec une espèce de levure haute, savoir le *Sacch. cerevisiæ* I, et que je conduisis comme les précédentes, en remplaçant seulement la gélatine au moût par la gélatine d'eau de levure sur laquelle furent semées des spores. Il se développa alors sur la gélatine une végétation qui donna de 1 à 3 vol. p. c. d'alcool de plus que la végétation correspondante, constamment cultivée en moût de bière. Plus tard, ces expériences furent répétées plusieurs fois et, bien que de temps à autre j'observasse des oscillations notables, dans la plupart des cas les végétations engendrées sur lesdites gélatines nourricières produisirent plus d'alcool que les végétations du moût. Autant que je puis actuellement pénétrer cet état de choses, je suis forcé d'admettre qu'il y a eu des particularités de race chez les individus employés au début des expériences et que le phénomène principal de la culture sur les gélatines est une sélection et non une transformation. Comme j'ai eu auparavant l'occasion de le faire ressortir, il y a une grande différence de pouvoir fermentaire chez les individus d'une seule et même culture pure; mais en général ces variétés n'ont qu'un caractère très fugace.

Ce cercle de recherches comprend encore et surtout celles que M. Biernacki a publiées en 1887 concernant l'action des antiseptiques et qui ont fait constater que, dans certaines conditions, de petites doses produisent une végétation douée d'un pouvoir fermentaire vis-à-vis de la production de l'alcool, pouvoir qui est plus grand qu'au début. Plus tard, MM. Märcker et Hayduck arrivèrent au même résultat, et récemment M. Effront aussi, comme on le sait. L'état de cette question n'a été ni approfondi ni expliqué.

Une autre série de mes recherches visait à affaiblir le pouvoir

fermentaire. On constata que, si la levure basse n° 1 de Carlsberg est cultivée en moût de bière à 32° C. durant huit cultures et de manière à inoculer chaque culture de sa précédente et à la laisser ensuite reposer jusqu'à ce que la fermentation cesse, et par conséquent sans aération particulière, on obtient alors une végétation donnant jusqu'à 2 vol. p. c. d'alcool de moins que la végétation par laquelle les expériences ont commencé. La fermentation eut lieu dans du moût marquant 14 p. c. Ball. avec addition de 10 p. c. de saccharose. Traitée de la même manière, la levure basse n° 2 de Carlsberg donna un résultat analogue.

Durant plusieurs années j'ai donné à quelques-unes des espèces de *Saccharomyces* décrites par moi une culture qui les empêchait de causer la fermentation alcoolique. Le point de départ était, soit des spores, soit des cellules végétatives ordinaires, soit des cellules des voiles. Les ancêtres de ces dernières avaient commencé à vivre il y avait sept ans à la surface du liquide, sous l'influence directe de l'air. En tout cas, pendant un immense nombre de générations, les végétations traitées n'avaient nullement fait preuve d'activité de pouvoir fermentaire vis-à-vis de la production de l'alcool; néanmoins elles persistèrent à produire de l'alcool, et avec une vigueur qui ne semblait pas affaiblie. Il en fut de même de la production de spores et de la formation d'invertase et de maltase. En somme, il a été impossible d'amener les cellules à ne plus développer les susdits enzymes. Nous pouvons bien causer un affaiblissement temporaire, mais rien au delà. S'agit-il, au contraire, de bactéries, on sait combien il est commun d'observer que durant la culture en laboratoire elles perdent complètement leur pouvoir fermentaire. Et inversement il n'a pas non plus été possible de transformer le plasma de la cellule du *Saccharomyces* de manière à susciter en lui une nouvelle productivité d'enzymes dont il n'était pas doué préalablement. En dépit de toutes les expériences faites, soit dans notre Laboratoire, soit ailleurs, les espèces telles que le *Sacch. apiculatus* refusent constamment d'intervertir et de faire fermenter les solutions de saccharose, et les espèces comme le *Sacch. Marxianus* et le *Sacch. Ludwigii* prennent la même attitude en face de la maltose. Voir aussi le mémoire de M. Klöcker dans la présente livraison.

A la série de variations qu'on vient de mentionner, se rattache également la suivante. Le *Sacch. Pastorianus* I est, on se le rappelle, une levure de maladie communiquant à la bière une odeur désagréable et un goût amer. D'après les recherches de MM. Mach et Portele, ce *Saccharomyces* n'en donne pas moins un bon vin, et mes recherches ont établi que, cultivé à 32° C., à travers de

nombreuses générations dans une solution de sucre de canne (10 p. c.) dans de l'eau de levure, ce *Saccharomyces* forme des cellules qui pendant un certain temps ont perdu les susdites propriétés délétères pour la fermentation de la bière. Toutefois une culture prolongée dans le moût de bière ramène promptement la végétation à son point de départ.

L'accommodabilité des cellules de cette espèce a été mentionnée en plusieurs endroits de mes divers mémoires. Ainsi, dans mes expériences sur les levures de maladie (*Compte rendu du Laborat. Carlsberg* II, 55 (1883) et III, 146 et 150 (1892)) j'ai également fait ressortir la relation intéressante en vertu de laquelle ces espèces ne causent les maladies que par infection au début de la fermentation principale; mais si cette infection n'a lieu que vers la fin de cette fermentation ou durant le temps de garde, elles sont incapables de produire leur effet dans les conditions ordinaires de la brasserie.

Dans une de mes recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation (*Unters. aus der Praxis der Gärungsindustrie, zweites Heft* (1892)) j'ai parlé de l'importance qu'a l'aération du moût avant qu'on y ajoute la levure. En cultivant à part dans du moût aéré les levures basses n^{os} 1 et 2 de Carlsberg, j'ai obtenu un levain qui, dans les conditions de brasserie, donna une bonne clarification normale. Si, au contraire, ces deux mêmes espèces de levures étaient cultivées dans un moût tout à fait pareil, mais non aéré, les végétations de levure résultantes avaient besoin de subir plusieurs fermentations en moût aéré avant de pouvoir fonctionner de la manière normale. La bière qu'elles produisaient avait surtout le défaut d'opaliser et d'être trouble. Cependant la levure n^o 2 revenait plus promptement à son état primitif que la levure n^o 1. Telle est la règle, mais, par exception, j'ai observé que le moût peut avoir une composition rendant superflue l'aération.

C'est ici le lieu le plus convenable pour mentionner la variation des espèces de levures de bière durant l'exploitation. Les communications qui suivent sont en substance l'extrait d'une conférence que j'ai faite aux étudiants de notre Laboratoire il y a deux ans (et traduite, en 1898, par M. Bělohoubek dans le *Casopis pro prumysl chemicky*, 1898). Il va de soi que les espèces de levures de bière peuvent varier autant en bien qu'en mal; nous mentionnerons brièvement ces deux faces. Comme on le sait, le système des cultures pures comprend un choix fait méthodiquement tant des espèces que des races. La question est de choisir les individus les mieux adaptés, c'est-à-dire ceux qui fondent une végétation ayant les propriétés désirées. Cela a naturellement entraîné les techniciens à chercher l'amélioration des races par une sélection. Les individus appartenant à une

seule et même race et ayant pour souche une seule et même culture provenant d'une cellule unique peuvent, ainsi qu'on l'a montré précédemment, fonder des variétés qui divergent manifestement et qui restent plus ou moins constantes, points qui seront éclaircis de plus près dans les expériences suivantes. Durant les premières années, après que j'eus introduit la nouvelle réforme dans la fermentation, je donnai la nouvelle direction à mes propres travaux dans les brasseries du Vieux et du Nouveau Carlsberg, m'occupant surtout des deux espèces de levure basse n° 1 et n° 2 fréquemment citées. Il en résulta des races qui à certains égards étaient meilleures que celles avec lesquelles j'avais débuté en 1883. Au point de vue botanique, elles concordaient bien avec celles de mon point de départ; mais, aux yeux du brasseur, elles différaient pourtant un peu. En plusieurs endroits de mes écrits j'ai fait de petites communications en ce sens. On a également fait de pareils essais dans la plupart des laboratoires de brasserie. Nous n'avons pas ici de règles applicables à tout; en somme, il faut tâtonner, et les races produites de cette manière ne persistent généralement pas, mais se perdent.

Il en est autrement des variétés que j'ai produites en pratiquant la culture à une température élevée: elles ont persisté durant l'exploitation et peuvent être obtenues à volonté; car ici nous pouvons procéder d'après une méthode certaine. La variété nouvelle, mentionnée page 14, de levure basse n° 1 de Carlsberg a donné, dans les conditions de la brasserie, une clarification un peu meilleure et une moindre atténuation sur la fin de la fermentation principale que son type d'origine, et elle s'est maintenue à ce niveau pendant plusieurs cultures pratiquées à la brasserie et qui absorbèrent quelques mois. Dans le sens considéré, elle peut bien être regardée comme représentant un progrès; mais on n'ose pas l'introduire dans l'exploitation, car elle continue à n'opérer que trop lentement. J'ai eu de meilleurs résultats de la variété asporogène de la levure basse n° 2 de Carlsberg produite par la culture susmentionnée en moût aéré à haute température et en renouvelant fréquemment le liquide. La première communication relative aux essais de brassage faits avec cette variété se trouve dans la susdite communication provisoire de 1890. Les caractères nouveaux de cette variété se sont produits, au fond, dans le même sens que pour la précédente, mais sans que j'aié observé des difficultés dans l'exploitation. A diverses époques on a fait des séries d'essais à la brasserie du Vieux Carlsberg dans le caves de fermentation et en se servant de petites cuves contenant chacune un hectolitre et un tiers de moût. La bière brassée avec cette variété était excellente; en général elle avait un goût plus riche et se clarifiait ordinaire-

ment mieux que celle de son type primitif; mais elle se conservait moins bien en bouteilles, car il s'y formait plus rapidement un précipité de levure. En tout cas, ces essais ont jalonné une voie pour arriver à obtenir de nouvelles variétés douées des principales propriétés susdites, probablement de la plupart des espèces de levures basses et, peut-être, de toutes. L'emploi d'une variété sans spores dans les brasseries met naturellement à même d'effectuer avec plus d'aisance et de sûreté qu'autrement l'analyse du levain quant à la levure sauvage.

On se souviendra qu'au début de son emploi dans l'exploitation, la levure de culture pure peut susciter des difficultés surtout pour la clarification et l'atténuation, plus rarement sous le rapport du goût. Durant les premières années qui suivirent l'introduction du système de culture pure, les inconvénients de cette variation furent l'objet de fréquentes discussions dans les journaux techniques, et servirent d'armes pour attaquer mes tentatives. Et pourtant il s'en faut que toutes les espèces et races donnent du mal, et les difficultés qui quelquefois surgissent ne durent que peu dans la plupart des cas; la levure produite dans les conditions qu'offre le laboratoire s'est donc alors accommodée aux conditions de brasserie, et fonctionne de la manière désirée. Il va de soi que dans l'exploitation même il peut se présenter des circonstances ayant pour effet qu'une espèce de levure qui jusqu'alors avait fonctionné d'une manière satisfaisante, commence à varier dans un sens fâcheux. Des oscillations mal à propos dans la composition du moût et le manque de propreté jouent ici un rôle important. L'emploi des cuves de bois est surtout défavorable à la fermentation, si l'on ne veille pas à en tenir la surface lisse et vernie. Quand le bois s'effile, les cellules de levure peuvent, durant nombre de générations, se multiplier dans des conditions qui s'écartent tout à fait de l'état normal. La même chose peut avoir lieu dans les conduits et surtout dans leurs joints. J'ai poursuivi durant des années mes recherches sur la variation dans l'exploitation. Voici comment je m'exprimais sur le résultat de cette étude, dans le *Compte rendu du Laborat. Carlsb. III*, 144 (1892): „Tant que les espèces de levure de bière sont exposées aux influences de la brasserie, elles ne subissent que de faibles variations qui sont de nature passagère. Considérées au point de vue biologique, ces variations nous portent plutôt à les déclarer tout à fait insignifiantes, tandis que, aux yeux du brasseur praticien, la chose se présente d'une autre manière. En effet, ces transformations peuvent se manifester d'une manière désagréable et parfois causer une perturbation sensible. Durant le cours de l'année, elles forment une ondulation dans le flot de l'exploitation;

quant à la cause propre, nous n'en avons pas même l'idée dans la plupart des cas." C'est là qu'on en est jusqu'à nouvel ordre.

Les journaux techniques de ces dernières années présentent de pareilles observations dues à MM. Delbrück, Jørgensen, Kukla, Lindner, Will et autres. Les races diffèrent de tendance dans le susdit égard; mais dans tous les cas on se sert du même moyen: l'introduction d'une nouvelle culture pure.

Quant à la variation qui peut résulter de la conservation, pendant un temps assez long, des levures soit dans une solution de saccharose, soit d'une autre manière, j'ai donné quelques renseignements dans le commencement de ce chapitre, comme aussi dans mon traité inséré au *Compte rendu du Laboratoire*, 1898. Du reste, dans une suite à ce dernier traité, j'aurai l'occasion de donner communication de quelques nouvelles recherches faites sur ce sujet; aussi je ne m'y arrêterai pas ici.

3. Nouvelles recherches sur les variétés asporogènes.

Nous venons de voir comment la cellule de levure est soumise de tous côtés aux fluctuations de la variation; dans tous les sens, les variétés surgissent présentant tous les différents degrés de permanence. Cependant ce ne sont que les variétés sans spores qui se laissent dominer entièrement par l'expérimentateur; elles présentent les conditions les plus nettes et les moins compliquées; nulle part nous ne trouverons une telle régularité qu'ici. En outre, ces variétés avec leurs qualités différentes sont les seules que pour le moment nous puissions considérer comme constantes. C'est ce qui leur donne aussi un intérêt spécial pratique comme points de départ pour la création de nouvelles races utiles à l'industrie. C'est pourquoi j'ai toujours insisté particulièrement sur l'étude de cette variation, qui a aussi été l'objet exclusif de mes nouvelles recherches que je communiquerai par la suite. Je commencerai par l'aperçu des méthodes, que j'ai promis auparavant; ensuite je mentionnerai les détails et expériences analytiques nécessaires, puis l'examen de la question fondamentale ayant pour but de connaître si c'est une transformation ou une sélection qui a lieu. Enfin j'expliquerai les différents facteurs dont dépend le phénomène.

Méthodes.

A moins d'indication contraire, j'ai fait les expériences de la manière suivante: j'avais pour point de départ une jeune végétation vigoureuse produisant une richesse de spores; elles provenaient d'une culture en moult, de vingt-quatre heures, à 25° C. J'ai toujours em-

ployé des végétations absolument pures provenant d'une cellule unique et me suis servi, pour la culture, des ballons Pasteur à deux cols ($\frac{1}{8}$ de litre). On pourra aussi se servir d'autres matras, mais dans ce cas-là l'évolution ne se produira pas exactement de la manière ci-après décrite. Deux fois par jour on a exposé le liquide à l'action de l'air en l'agitant. De cette manière, les cellules ont été transportées dans d'autres zones de nutrition, en même temps que l'acide carbonique a été expulsé et que l'oxygénation a eu lieu. Chaque culture a séjourné 24 heures aux températures indiquées dans la description suivante des expériences, et la subséquente a été infectée par un échantillon moyen de la précédente. Aux différentes phases de l'expérience, on a prélevé des échantillons moyens, et les individus en ont été isolés pour essayer si les végétations qu'ils avaient formées étaient asporogènes ou non. Dans mes premières expériences, j'ai employé ces échantillons pour des cultures sur plaques avec de la gélatine au moût, en les mêlant comme à l'ordinaire avec la gélatine. L'apparence des colonies ne donnant aucune indication sur leurs qualités sporogènes, elles furent transportées dans de petits matras chargés de moût, et ensuite les végétations obtenues de cette manière furent essayées dans des cultures ordinaires, sur des blocs de plâtre, à 25° C. Ce procédé est très circonstancié, et, comme plus tard, on a dû examiner plusieurs centaines d'individus de chaque phase, on a essayé de le simplifier en répartissant les cellules, au moyen d'un pinceau en platine, sur la surface de gélatine au moût solide, placée dans des boîtes de Petri, et puis, en transportant les colonies qu'elles avaient formées, directement sur les blocs de plâtre. Dans ce but, la surface circulaire de ces derniers, dont le diamètre était de 3^{cm}8, fut divisée en carrés par des traits au crayon, de manière qu'on pût placer 12 colonies sur chaque bloc. Comme à l'ordinaire, ces cultures furent faites à 25° C. L'analyse eut lieu quatre ou cinq jours après. Les résultats que présente cette manière de répartir sur la gélatine figée les cellules, dans le but d'obtenir des cultures provenant chacune d'une cellule unique, sont aussi bons que ceux qui sont dus à la répartition des cellules en gélatine liquide. Comme auparavant, j'ai fait le contrôle en répartissant sur la surface de la gélatine au moût figée un mélange composé de *Sacch. apiculatus* et d'une autre espèce de levure de forme nettement différente. Le résultat fut qu'environ les 99 pour cent des colonies contenaient des cultures pures. Ici, comme à l'ordinaire, on doit s'appliquer à se servir d'échantillons moyens pour les analyses. Les colonies appartiennent ordinairement à deux catégories, les grandes et les petites colonies. Parmi ces dernières, on trouve le plus grand pour-cent de végétations asporogènes. Soit qu'on

se serve de l'une ou de l'autre forme de répartition sur plaques, le résultat sera que la faculté sporogène des cellules diminuera un peu par la culture sur ou dans la gélatine; il arrive ainsi ordinairement que quelques-unes des végétations de la gélatine au moût ne produisent pas de spores sur les blocs de plâtre, si elles sont transportées directement sur ces derniers, tandis qu'après une seule culture en moût, elles donnent une végétation qui pourra produire une richesse de spores. Cela concerne surtout les petites colonies; aussi le plus pratique sera-t-il ordinairement de transporter celles-ci immédiatement dans la culture en moût pour commencer plus tard la culture pour obtenir des spores.

Cependant ce n'est pas là que finit l'analyse. Aussi parmi les végétations engendrées en moût, il y en a qui n'ont cessé que provisoirement de produire des spores. Dans les communications précédentes sur le *Sacch. Ludwigii*, on a déjà mentionné que cette faculté peut revenir aux cellules durant une longue culture en moût. Un grand nombre des cellules qui, au commencement du traitement aux températures élevées, se montrent asporogènes, reviennent vite, dans ces circonstances, à la production des spores; dans d'autres cas, cette faculté ne leur revient que dans l'espace d'une à deux années. On trouve tous les degrés possibles; mais ce n'est qu'un très petit nombre qui, au bout d'une année, change encore de cette manière. Si dans la suite je parle de variétés constantes, cette dénomination se rapportera à celles qui ont subi ce contrôle. L'expérience a démontré qu'à cet égard la meilleure méthode est de faire séjourner la végétation dont il s'agit en moût de bière à la température ordinaire et de renouveler le liquide tous les trois ou quatre mois; ce dernier procédé est également nécessaire, si l'on veut se garantir de la mort des cellules. Sur la marche de l'analyse, voir en outre les tableaux des pages 35 et 36.

Il y a bon nombre d'années que j'ai fait une expérience d'hiémation d'une de mes variétés asporogènes. J'ai placé les cellules dans des tubes d'argile compacts chargés de terre stérilisée et que j'ai enfouis dans un jardin près du Laboratoire. Quand, quelques mois après, j'en ai prélevé un échantillon, elles étaient vivantes et produisaient des spores. Cependant en examinant de plus près la végétation ensemencée, j'ai constaté qu'elle n'appartenait pas à une variété constante, comme je le croyais à cette époque-là. La méthode de régénération par la culture en moût, ci-dessus décrite, est la seule que nous connaissons.

C'est à tort que parfois on emploie le mot régénération pour désigner ce qui se passe quand on a pour point de départ une végétation dont la plupart des cellules sont asporogènes et qu'on a produit une végétation vigoureuse sporogène en en séparant les quelques cellules

qui ont gardé cette faculté. Il va de soi que ces dernières peuvent fonder une végétation sporifique. Elles n'ont en effet jamais perdu cette faculté, mais restent ce qu'elles étaient. La même considération s'applique également, si nous prenons la spore elle-même comme point de départ. Mais il en est tout autrement des cas ci-dessus décrits, où nous nous sommes occupés de végétations qui, en ce moment-là, ne contenaient pas une seule cellule pouvant donner des spores; là, la faculté reproductive était perdue jusqu'à nouvel ordre et elle n'était revenue que par suite d'une culture prolongée en moût. Pour ne pas causer de malentendus, il faut toujours, quand on veut se servir de dénominations telles que régénération et dégénération, considérer les individus mêmes et non pas la foule complexe des cellules différentes de toute une culture.

La plupart des expériences furent faites, de la manière ci-dessus décrite, en moût de bière basse de garde ordinaire marquant 14 p. c. Ball., qui avait séjourné assez longtemps et qui s'était oxygéné de cette manière. Pour les expériences qui ont été faites dans d'autres liquides, on a spécifié ces derniers.

Une série assez considérable a été faite sur gélatine au moût composée du moût de bière susmentionné avec 8 p. c. de gélatine. Une couche épaisse était installée dans un matras Freudenberg de manière à présenter une surface oblique. Pour réduire l'évaporation et permettre en même temps l'aération et l'échappement de l'acide carbonique, on appliqua, au moyen d'un tube de caoutchouc, un petit bec en verre en S sur le tuyau du capuchon, construction semblable d'ailleurs à celle du ballon Pasteur à deux cols. Dans ce cas, on a également choisi pour point de départ de jeunes cellules vigoureuses; elles étaient placées en cultures par stries superficielles sur la gélatine à 25° C. et à la température ordinaire, sans renouvellements; chaque série ne se composait donc que d'une culture. Dans les cas peu nombreux où les expériences ont été faites d'une autre manière, on l'a mentionné dans la suite. Les analyses ont été faites d'après les méthodes ci-dessus décrites.

Expériences faites dans les liquides nutritifs.

Dans la suite, je mentionne les expériences faites avec le *Sacch. Pastorianus* I et la levure de vin *Johannisberg* II qu'ont fait connaître les expériences faites par MM. Aderhold et Wortmann.

Sacch. Pastorianus I.

En ce qui concerne cette espèce, la température maxima pour le bourgeonnement en moût de bière est d'environ 34° C., et pour la

production de spores sur bloc de plâtre d'environ 29° C. Du point de départ de la série d'expériences ci-après décrite, on a isolé 1000 cellules. Elles ont toutes formé des végétations à spores, et il était impossible de constater l'existence de cellules asporogènes dans la végétation ayant servi de point de départ à l'expérience. La température était de 32° C.

Dans la 2^e culture on a trouvé 1 p. c. de cellules constamm. asporogènes.

—	.	4 ^e	—	.	.	—	60	—	.	—	—	—
—	.	7 ^e	—	.	.	—	100	—	.	—	—	—

Ces chiffres ne sont cités que comme exemples pris d'une série d'expériences pour donner une idée de l'évolution qui se passe. Les séries faites à différentes époques montrent, il est vrai, des oscillations sensibles à l'égard des chiffres, mais elles présentent toutes la marque caractéristique qu'au commencement il n'y a que peu de cellules asporogènes, tandis que leur nombre augmente à mesure qu'on parvient aux cultures postérieures. Après sept jours de culture dans les circonstances ci-dessus indiquées, toutes les cellules étaient ordinairement asporogènes.

Dans la végétation par laquelle la série ci-dessus a commencé, il n'y avait donc pas de cellules asporogènes, tandis que j'en ai démontré l'existence dans les points de départ de quelques-unes des autres séries que j'ai faites. Effectivement, en faisant aussi, dans chacune d'elles, une analyse de 1000 cellules, j'ai trouvé que $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{10}$ p. c. en étaient asporogènes.

Il n'y a que peu d'individus dont le bourgeonnement et la formation de spores aient lieu aux plus hautes températures où l'espèce exerce ces fonctions: un assez grand nombre s'arrête déjà à un degré au-dessous, et il y en a d'autres qui n'arrivent même pas à ce degré. Ici, comme pour toutes les fonctions, il existe toute une échelle: dans la physiologie, nous sommes cependant habitués à de semblables irrégularités. Toutefois, la règle sera toujours que la température exigible pour la création de la variété asporogène est entre la température maxima de la cellule en question pour la formation de spores et sa température maxima pour le bourgeonnement. Conformément à ce qui précède, on trouvera qu'on peut aussi produire la variété asporogène, si l'on emploie 28° C. au lieu de 32°. Si le traitement se fait de la manière ci-dessus décrite à la première de ces températures, la 17^e culture contiendra un grand nombre de cellules asporogènes; mais bien que le traitement ait eu lieu avec tant de cultures, les cellules sporogènes auront cependant toujours le prépondérance, et même encore dans la 21^e culture, on trouvera, en grand

nombre, des cellules de cette catégorie. Il y a donc, comme on devrait s'y attendre, une grande différence entre les effets que produisent les deux températures 28° et 32° C.

Johannisberg II.

Cette espèce fut choisie pour les expériences parce que c'est une espèce de levure sauvage qui n'a été soumise qu'assez peu de temps à la culture du laboratoire, et enfin parce que son pouvoir sporifique est beaucoup plus grand que celui de l'espèce précédente et de plusieurs autres espèces, environ 100 p. c. de ses cellules cultivées sur bloc de plâtre à 25° C. développant ces corps de reproduction. Sa température maxima pour le bourgeonnement en moût de bière est de 37° à 38° C. et, pour la formation de spores en culture sur bloc de plâtre, de 33° à 34° C. Quant à quelques-unes des séries d'expériences, j'avais pris pour point de départ une cellule végétative, pour les autres je pris une spore. Ici, on a aussi contrôlé 1000 cellules appartenant au point de départ de chaque série; mais on n'a jamais réussi à découvrir des variétés asporogènes; toutes les cellules ont fondé des végétations douées d'une formation de spores vigoureuse. A titre d'exemple de l'évolution, je citerai la série suivante faite à 36° C.

Dans la 3^e culture, on a trouvé 4 p. c. de cellules constamm. asporogènes.

—	-	4 ^e	—	-	-	—	10	—	.	—	—	—
—	-	5 ^e	—	-	-	—	20	—	.	—	—	—

Dans la 9^e culture, on a encore trouvé des cellules sporogènes. En somme, cette espèce se distinguait de la précédente par le fait que, même dans les végétations des cultures postérieures, on trouvait ordinairement quelques cellules de la dernière catégorie.

La variété asporogène se montre également, si la culture se fait à 37° C. et aux températures variant de 32° à 36° C. Toutefois, à la température de 32° — 33° C., on n'a encore trouvé dans la 20^e culture que 4 p. c. de cellules constamment asporogènes, par conséquent un nombre beaucoup plus petit qu'après le traitement à 36° C. Ce qui est dit ci-dessus du *Sacch. Pastorianus* I en ce qui concerne la culture aux températures élevées et aux plus basses températures, s'applique aussi à cette espèce.

Les séries d'expériences précédentes appartiennent à celles où, ainsi qu'il a été mentionné dans la description des méthodes, on transporte un échantillon moyen d'une culture à l'autre. Cependant les expériences relatives à cette espèce ont aussi été exécutées de façon à opérer dans toutes les cultures avec toute la masse de levure et qu'à la formation de chaque nouvelle culture on n'a écarté que le liquide

couvrant la levure, lequel a été remplacé par de nouveau moût. Dans ces expériences, la 1^{re} culture séjourna en outre 3 jours à 36° C., et chacune des cultures suivantes 2 jours.

Dans la 2^e culture, on a trouvé $\frac{1}{2}$ p. c. de cellules constamm. asporogènes.

—	-	4 ^e	—	-	-	30	—	-	—	—	—
—	-	6 ^e	—	-	-	50	—	-	—	—	—
—	-	13 ^e	—	-	-	90	—	-	—	—	—

Ainsi qu'il est mentionné ci-dessus, j'ai fait plusieurs séries d'expériences avec chacune des espèces, mais pour les citer toutes il me faudrait donner trop d'ampleur au présent mémoire.

Expériences faites sur un milieu nutritif solide.

La méthode a été décrite page 21. Les expériences sur gélatine au moût à 25° C. ont donné les résultats suivants:

Sacch. cerevisiæ I.

Au bout de 3 mois, un assez grand nombre de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Pastorianus I.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Pastorianus II.

Au bout de 1 an et 9 mois, un assez grand nombre de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Pastorianus III.

Au bout de 1 an et 9 mois, très peu de cellules constamment asporogènes.

Sacch. ellipsoideus I.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Sacch. ellipsoideus II.

Au bout de 1 an et 9 mois, un petit nombre de cellules constamment asporogènes.

Johannisberg II.

Au bout de 1 an, très peu de cellules constamment asporogènes.

Sacch. Ludwigii.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Sacch. membrancefaciens.

Au bout de 1 an et 9 mois, point de cellules constamment asporogènes.

Je n'ai donc pas constaté l'existence de la variété constamment asporogène chez toutes les espèces; mais dans les cas où je l'ai trouvée, le nombre des cellules qui la représentaient était toujours relativement peu considérable. Comme on le voit, les cellules sporogènes prédominaient aussi dans les très vieilles cultures. Chez toutes les espèces j'ai observé une variation fugace dans ce sens. De même que mes anciennes expériences relatives au *Sacch. Ludwigii*, de 1889, ces dernières ont aussi donné comme résultat qu'en isolant les individus d'une pareille végétation dans des cultures particulières, je pouvais obtenir des végétations produisant soit des spores nombreuses, soit très peu de spores, soit point de spores, et que cette dernière catégorie se conservait souvent durant plusieurs cultures avant de retrouver sa propriété sporifique.

Dans les expériences pratiquées sur la gélatine au moût et à la température ordinaire, j'ai observé la variété constamment asporogène dans le *Sacch. cerevisiæ* I au bout de 4 mois; dans le *Johannisberg* II, au bout de 1 an et 3 mois, et, dans le *Sacch. anomalus*, au bout de 6 mois, mais toujours chez un petit nombre d'individus.

Une variété constamment asporogène de *Sacch. anomalus* s'est aussi montrée dans une expérience pratiquée sur gélatine nutritive au moût additionné d'agar-agar (moût additionné de $1\frac{1}{2}$ p. c. d'agar-agar et de 5 p. c. de gélatine) à 34° C. Il semble que cette espèce ne puisse pas cesser de donner des voiles; en tous cas, celles de ses végétations asporogènes que j'ai observées, ont toutes continué cette formation.

Le *Sacch. Pastorianus* I n'a pas produit la variété constamment asporogène dans les expériences susmentionnées sur gélatine au moût à 25° C. et à la température ordinaire, tandis que cette formation a eu lieu sur gélatine nutritive au moût additionné d'agar-agar à environ 32° C. Le point de départ était, comme à l'ordinaire, l'inoculation superficielle d'une végétation douée d'une faculté sporogène vigoureuse. Différemment des expériences précédentes sur un milieu nutritif solide, de nombreux renouvellements ont eu lieu; chaque culture a séjourné 1 ou 2 jours. Dans la 22^e culture, on a observé de nombreuses cellules sporogènes, tandis que la 31^e culture se composait d'une végétation dont toutes les cellules étaient sans spores et qui gardaient constamment cette propriété.

De cette série d'expériences, j'ai formé une nouvelle série en prenant la 20^e culture pour point de départ et en la faisant séjourner à 34° au lieu de 32° C. Les cellules produites de cette manière dans l'espace de 3 ou 4 jours se sont aussi montrées constamment asporogènes.

Sélection ou transformation?

Si l'on parcourt la littérature relative à la variation des plantes, on verra qu'en général la question de savoir si les phénomènes décrits sont dus à une sélection ou à une transformation, n'est pas posée, et dans le peu de cas où cette question est discutée, les opinions sont partagées et les résultats incertains.

Dans le chapitre introductif de son ouvrage intitulé *De danske Blomsterplanters Naturhistorie* (Biologie des Phanérogames danoises, 1895—99) M. Raunkiær soumet cette question à un examen détaillé. Il se range à l'avis des auteurs qui prétendent que les preuves qui sont ordinairement produites à l'appui de l'opinion que des phénomènes de variation sont dus à une transformation produite sous l'influence des facteurs extérieurs, ne sont pas satisfaisantes. Voici comment il s'exprime (p. LII) sur mes recherches: „Il paraît que nous avons ici la première preuve réelle d'une transformation de caractère produite par des facteurs extérieurs; mais seulement si l'on a le droit de le supposer, il n'existe aucune multiplication sexuelle chez les levures, de sorte qu'on ne peut pas expliquer le résultat obtenu en renvoyant aux différences qu'on trouve parmi les individus appartenant aux générations qui émanent d'un croisement“. Dans les communications provisoires auxquelles M. Raunkiær fait allusion, je ne me suis pas prononcé sur ce point; toutefois, dans la suite, j'ai fait de vastes recherches dans ce sens également, mais je n'ai jamais observé aucun indice d'une pareille multiplication.

En ce qui concerne les plantes supérieures, ce sont surtout les recherches sur les types sans semences et, quant aux microorganismes, les études de la forme asporogène du microbe de la fièvre charbonneuse, qui nous intéressent ici. Il existe un grand nombre de Phanérogames dont on connaît des variétés aspermes. Elles sont déjà mentionnées dans les plus anciens ouvrages de botanique et, par conséquent, elles sont observées depuis un temps immémorial. Les mieux connues sont les variétés aux grands fruits comestibles du bananier (*Musa sapientum*) et la variété du raisin dite Corinthe (*Vitis vinifera* var. *apyrena*). On trouve les premières dans un grand nombre de types cultivés; celles-ci, suivant les observations faites en Amérique par M. Rob. Brown et par d'autres, sont toutes sans semences, et la multiplication se fait donc toujours par voie végétative. Après des siècles de culture, elles se sont maintenues constantes. Au contraire, dans l'Asie méridionale, habitat originaire du bananier, les plantes sauvages se multiplient par graines, et les variétés aspermes qu'on y cultive retournent souvent aussi, à ce qu'on dit, au type primitif. En ce qui concerne la variété asperme susmentionnée du raisin, toutes les

relations portent qu'elle est tout à fait constante. On n'a que des renseignements incertains sur l'origine de ces variétés, et l'on ne sait rien de ce qu'on peut attribuer aux agents extérieurs et aux agents intérieurs. Depuis longtemps on connaît également des formes asporogènes de plusieurs des Cryptogames supérieures; mais à leur égard non plus nous n'avons pas de renseignements sur les questions qui sont d'un intérêt particulier pour nous.

Considérons ensuite les recherches faites à ce sujet sur la bactériodie charbonneuse (*Bacillus Anthracis*). Pasteur, on le sait, publia une méthode de l'atténuation du virus. D'après cette méthode, les cellules sont cultivées un certain temps dans le bouillon neutre de poule à 42°—43° C. sans renouvellement du liquide nutritif. Dans quelques recherches sur l'influence qu'exercent certains toxiques à l'égard de cet affaiblissement, MM. Chamberland et Roux (*Compt. rend. LXXXVI* (1883) et *Ann. de l'Inst. Past. IV* (1890)) ont constaté que les cellules perdent, au moins provisoirement, leur pouvoir sporifique, si on les cultive dans du bouillon additionné d'un peu d'acide phénique ou de bichromate de potasse, tandis qu'il n'en était pas ainsi dans l'expérience de Pasteur. Pendant cette expérience, les cellules n'ont produit, il est vrai, que peu ou point de spores; mais elles devenaient aussitôt vigoureusement sporifiques, si on les cultivait dans le susdit liquide nutritif à une température favorable. M. Heim répétant l'expérience de Chamberland et Roux constata qu'après avoir été traitées par les susdites matières chimiques, un grand nombre des cellules gardaient leur pouvoir sporifique et que les cellules qui pour le moment avaient cessé de donner des spores, reprenaient assez vite cette fonction après avoir été placées dans des milieux nutritifs favorables.

Après que j'eus publié ma deuxième communication sur les variétés asporogènes des *Saccharomyces*, M. Phisalix, dans ses expériences faites avec le *Bacillus Anthracis*, a employé la méthode décrite par moi en le cultivant par des renouvellements fréquents du liquide nutritif voisin de la température maxima pour la multiplication végétative (*Compt. rend. CXIV* (1892)). Il réussit de cette manière à produire une variété asporogène qui se maintenait même si on la cultivait dans du bouillon à une température favorable à la formation de spores. Cette expérience présenta assurément une plus grande constance et plus de régularité que celle de Chamberland et Roux. C'est seulement quand on ajoutait au dit bouillon quelques gouttes de sang d'un cobaye que les cellules retournaient à la formation de spores. Conséquemment, aussi dans l'expérience de Phisalix, la variation n'a été que provisoire. Conformément à ce fait, les cellules de la variété produite par lui contenaient des corpuscules brillants, où ce savant et

M. Chauveau voient des spores rudimentaires. La question fondamentale de savoir si la variation provisoire que je viens de décrire, est due à une sélection ou à une transformation, n'a point été examinée.

M. Alfr. Fischer (Vorlesungen über Bakterien, 1897, pp. 27, 70—72, 123—24) regarde l'atténuation du virus et la perte du pouvoir sporifique chez la bactérie charbonneuse comme un signe d'affaiblissement et de dégénération générale. Selon lui, on n'a engendré aucune nouvelle race vivace et aucune transformation ne s'est produite: ce n'est là qu'une modification passagère et malade. C'est à peu près de la même manière que Fischer considère mes variétés asporogènes des *Saccharomyces*, et il pense que les expériences faites jusqu'ici pour engendrer artificiellement des races douées de nouvelles propriétés morphologiques, ne sont pas convaincantes. La discussion de la question qu'il a posée concernant l'affaiblissement sera mieux à sa place dans mon prochain mémoire, où je me propose surtout de mentionner les propriétés des *Saccharomyces* asporogènes; les autres objections formulées par Fischer, seront mises en lumière dans le présent travail.

Examinons maintenant quel est le rapport entre mes expériences ci-dessus décrites et la question: Sélection ou transformation? Mes expériences faites avec le *Sacch. Pastorianus* I sont un peu obscures sur un point: comme on se le rappelle, il y avait des cellules asporogènes dans quelques-uns des points de départ. Si dans d'autres cas on n'en a pas constaté l'existence, la cause en est peut-être que j'ai pris pour base une cellule qui n'a eu aucune faculté de fonder une végétation mixte. Si nous pouvions simplement admettre ce point de vue, tout s'arrangerait à cet égard; mais on n'en a pas la certitude, puisque, comme je l'ai dit, on a souvent constaté l'existence de cellules asporogènes dans les végétations par lesquelles ont commencé les expériences. Si nous avons dû nous servir spécialement des expériences relatives à cette espèce pour élucider la question importante dont il s'agit, il nous eût fallu examiner les phénomènes de multiplication des différentes catégories de cellules qui apparaissent durant la culture et, en général, la concurrence qui a lieu. Mais ces recherches sont tellement difficiles, que je ne pourrai donner des renseignements à ce sujet que dans un mémoire ultérieur.

Pour approfondir la question: Sélection ou transformation? je me suis servi surtout du *Johannisberg* II. Bien que, comme on se le rappelle, j'aie fait successivement plusieurs milliers d'analyses de cette espèce, il n'a pas été possible de signaler une seule cellule qui pût fonder une végétation asporogène. Le point de départ des expériences était parfaitement pur dans tous les cas. Peut-être, toutefois, un scepti-

que extrême objecterait-il que si l'on avait encore augmenté le nombre des analyses, on eût pu trouver éventuellement un individu de la catégorie en question. La somme d'analyses étant aussi grande que dans le cas présent, une pareille objection, si elle était formulée, serait sans importance; mais heureusement l'argumentation n'a pas besoin de s'appuyer exclusivement sur l'examen du point de départ: nous pourrions aussi éclaircir le problème par d'autres voies.

Supposons qu'il y ait eu quelques cellules asporogènes dans les végétations par lesquelles les expériences ont commencé et que ce ne soit qu'une sélection et non une transformation qui a eu lieu; alors nous ne pourrions pas attendre que l'expérience réussisse avec toutes les cellules, mais il faut, dans ce cas, que nous ayons aussi des séries d'expériences qui persistent à se composer exclusivement de cellules sporogènes. En effet, l'analyse nous a appris avec certitude que cette dernière catégorie a la prépondérance absolue dans la semence. Cependant on constate que ceci n'arrive pas, et cela non seulement en ce qui concerne les deux espèces dont nous avons parlé ici, mais pour toutes les autres espèces qui ont été essayées, sans exception aucune. En un mot, la variation signalée est un phénomène général qui se présente toujours quand on soumet les cellules à la culture qu'on vient de décrire. Nous arrivons également d'un autre côté au même résultat principal.

Le point de départ de nos expériences relatives au *Johannisberg II* consistait toujours en cellules qui fondaient des végétations largement sporogènes. Quant à des cellules qui fondaient des végétations contenant très peu de cellules sporogènes, ou à des cellules qui jusqu'à nouvel ordre avaient cessé complètement de donner des spores, il n'y en avait point, pas plus que de cellules constamment asporogènes. Or, trouvant toujours ces formes intermédiaires après le commencement du traitement à la haute température et surtout dans les premières cultures, cela nous montre également que c'est une transformation qui a lieu. Si l'apparition de la variété asporogène ne dépendait que d'une sélection, on n'en aurait pas besoin du tout. Il va sans dire que, côte à côte à la transformation, il y a toujours concurrence et sélection.

Examinons de plus près ces formes intermédiaires. Si nous prenons une quelconque des séries d'expériences mentionnées dans ce qui précède, nous verrons que, tandis que l'analyse de 1000 cellules du point de départ nous donne toujours comme résultat qu'elles produisent toutes des végétations sporogènes, nous n'avons, après le commencement de la culture, qu'à isoler un nombre moitié moindre de cellules pour y trouver aussitôt des cellules asporogènes. Déjà, dans

la 2^e culture, elles existent en grand nombre, et en transportant directement sur blocs de plâtre les colonies formées sur gélatine au moût par cette culture, on verra qu'un grand nombre de ces végétations ne donnent pas de spores. Après quelques cultures en moût de bière, beaucoup d'entre elles retournent à l'état normal, tandis que d'autres se maintiennent encore constantes au bout de plus d'un an. Dans les cultures suivantes, nous trouverons un plus grand nombre de cellules constamment asporogènes. Au fur et à mesure du traitement, nous aurons, comme on l'a dit plus haut, un plus grand pour-cent de cellules asporogènes, et le nombre de celles qui après une culture continue en moût retournent à la forme sporogène, diminue toujours.

Aux différentes phases du traitement, nous pouvons trouver des cellules qui nous donnent des végétations possédant tous les degrés de faculté sporogène depuis 100 p. c. jusqu'à 0 p. c. Il vaut aussi la peine de remarquer ici le fait intéressant que, surtout dans les dernières cultures, nous pouvons isoler des cellules produisant chacune une descendance composée d'individus dont quelques-uns sont asporogènes, d'autres au contraire fortement sporifiques, et qui contient en outre des formes intermédiaires entre ces deux extrêmes. En continuant la culture à une température favorable et en répétant dans une végétation nouvelle l'isolement des cellules, on peut reproduire ce phénomène de telle sorte qu'une cellule sporogène détermine encore la formation des trois susdites catégories, et les cellules asporogènes qui apparaissent dans ces végétations peuvent conserver cette propriété à travers nombre de générations. On arrive à un résultat analogue en scindant la catégorie qui se distingue par la formation d'un très petit nombre de spores. On obtient également dans ce cas les trois catégories: des végétations produisant quantité de spores, très peu de spores et point de spores, et la catégorie très peu sporifique peut souvent se maintenir à travers des cultures très nombreuses. A ce sujet, j'ai fait des observations pendant plus de deux ans; une variété constante a fait son apparition. Cet état varié nous montre que l'équilibre du pouvoir sporifique des cellules a été diversement ébranlé, et voilà encore un phénomène nouveau, inconnu au point de départ.

Ainsi, ce n'est pas seulement l'analyse du point de départ, mais encore toutes les recherches des différents côtés du phénomène, qui nous montrent que c'est une transformation qui a lieu, et nous avons tout lieu d'admettre que cela ne s'applique pas seulement à la susdite espèce, mais encore à toutes les autres espèces de *Saccharomyces*. Comme on l'a vu, un appui important de cette opinion, c'est le fait que non seulement chaque

cellule végétative, mais même chaque spore fonde une végétation que le traitement décrit rend asporogène.

Si nous soumettons les expériences sur gélatine au moût à une analyse semblable à celle que nous venons de décrire, nous verrons également que, dans le plasma de ces cellules, il a surgi une combinaison nouvelle et que, dans ce cas-là, la variation tient aussi à une transformation.

Sur les conditions de la transformation.

Dans les recherches qui vont suivre, on traitera d'abord les expériences faites dans des liquides et ensuite les expériences pratiquées sur un milieu nutritif solide. Quant aux premières, il faut distinguer les facteurs suivants: la composition chimique, les oscillations dues à l'agitation, l'aération et la température. Examinons séparément chacun de ces facteurs.

Si nous considérons les expériences décrites faites en moût de bière, nous éprouverons aussitôt l'impression que ce n'est guère sa composition chimique spéciale qui détermine la transformation. En effet, le moût de bière est une substance très variable, même dans le cas où on le tire d'une seule et même brasserie; néanmoins, comme on se le rappelle, la transformation se produisait toujours, et il en était ainsi, non seulement des deux espèces sur lesquelles portaient principalement les expériences mentionnées dans le présent travail, mais encore de toutes les espèces essayées.

Pour éclaircir cette question, j'ai fait des expériences avec d'autres liquides que le susdit; la méthode était du reste la même. Quant au Sacch. Pastorianus I, elles furent pratiquées soit dans de l'eau distillée, soit dans des solutions d'eau de levure additionnée, dans une série, de 10 p. c. de saccharose, dans une autre, de 10 p. c. de dextrose, et, dans une troisième, de 5—10 p. c. de maltose. Dans les trois solutions sucrées, la transformation eut lieu de la même manière que dans le moût, toutes les cellules de la 7^e culture ayant été transformées. Dans une des séries d'expériences faites dans l'eau, on ne trouva dans la 7^e culture point de cellules transformées, tandis que, dans une autre expérience semblable, il y eut une seule cellule asporogène. Autrefois j'ai vu dans ce phénomène un signe de ce qu'une transformation n'avait probablement pas lieu dans l'eau; les expériences ci-dessous faites avec le Johannisberg II démontrent qu'en tout cas cela ne s'applique pas à cette espèce. Ces expériences furent faites soit dans de l'eau distillée, soit dans une solution composées des substances suivantes:

peptone.....	1 p. c.
maltose.....	5 —

1 ^o phosphate de potassium	0,3 p. c.
sulfate de magnésium	0,5 —
eau.....	93,2 —

La levure employée à cette dernière expérience avait été engendrée dans le liquide nutritif décrit, puis lavée, pendant quatre heures et à environ 5^o C., avec de l'eau stérilisée. Le traitement eut lieu à 36^o C.; il était le même que dans toutes les expériences correspondantes en moût de bière ci-dessus décrites. Vers la fin de la 8^e culture, on fit répartir sur plaques les cellules, ce qui donna comme résultat qu'à cette phase on trouvait quelques cellules constamment asporogènes; mais en pleine 15^e culture encore, le nombre des cellules de cette catégorie n'était pas grand.

J'ai fait deux expériences avec cette même espèce dans de l'eau distillée, d'ailleurs de la même manière que la précédente. Toutefois, dans l'une de ces expériences, le lavage a eu lieu d'une manière plus radicale encore, à savoir pendant trois jours avec des renouvellements répétés de l'eau et à 2^o C. Dans ces expériences, la levure avait été engendrée en culture en moût. Après que le traitement eut atteint, à 36^o, la fin de la 4^e culture, on trouva un petit nombre de cellules constamment transformées, et dans les cultures postérieures ce nombre augmenta; mais dans la 15^e culture il y avait toutefois de nombreuses cellules sporogènes.

Ces expériences nous apprennent ainsi que la transformation se produit dans des liquides d'une composition chimique très différente, et même dans de l'eau distillée. Un liquide d'une composition déterminée n'est donc pas nécessaire. La composition chimique ne joue un rôle qu'autant que, dans l'eau et dans les autres liquides défavorables à la nutrition et à la multiplication, on n'obtient qu'un petit nombre de cellules transformées, et que, dans le moût de bière et dans les solutions sucrées en eau de levure susmentionnées, on en a au contraire un grand nombre.

Examinons ensuite si les oscillations du liquide dues à l'agitation qu'on pratique deux fois toutes les vingt-quatre heures en vue de l'aération, exercent ou non quelque influence sur la transformation. Pour éclaircir cette question, j'ai fait de la manière suivante quelques séries d'expériences avec le *Sacch. Pastorianus* I à 32^o C. et le *Johannisberg* II à 36^o C. Après avoir mis la levure dans des ballons chargés du moût ordinaire, je les plaçai aux températures indiquées, après quoi ils furent abandonnés pendant vingt-quatre heures. Puis on enleva le liquide, et un échantillon moyen du précipité de la levure fut transporté dans d'autres ballons chargés de moût. En un mot, les cultures se formèrent de la même manière que dans les ex-

périences ordinaires de transformation; seulement les levures ne furent exposées à aucune agitation. La transformation eut lieu tout de même, et par conséquent on en vint à constater que les oscillations ne sont pas nécessaires. Toutefois elles ont une importance indirecte en ce qu'elles ont pour effet d'éliminer l'acide carbonique, de mettre les cellules en contact avec de nouvelles particules nutritives et de faire affluer l'air.

Passons à l'étude des deux facteurs, aération et température.

La première question à poser à propos de l'aération touche à la possibilité de produire une transformation par l'air sans l'aide d'une haute température. C'est pourquoi les expériences qui suivent ont été faites avec les deux espèces susdites. Dans la première série, le dispositif des expériences fut exactement celui qu'on a décrit plus haut pour les essais ordinaires de transformation dans le moût de bière, à cela près que les ballons furent tenus à 25° C. au lieu de subir de hautes températures. Bien que ces expériences aient été prolongées à travers de nombreuses cultures et que plusieurs de ces cultures aient subi un très grand nombre d'analyses, il n'y a pas eu signe de transformation; cette transformation ne se produit pas dans les conditions d'expériences indiquées. On pourrait cependant croire qu'elle aurait lieu, si l'on augmentait la quantité d'air et le degré d'oxydation; aussi a-t-on fait de nouvelles expériences avec les deux espèces, soit en effleurant le liquide d'un courant d'air uniforme et continu, soit par insufflation d'air dans le liquide même, ce qui ôtait toute chance d'accumulation à l'acide carbonique formé durant la fermentation; surtout dans le dernier cas, l'aération était très active. On y a ajouté des séries d'expériences analogues faites avec de l'oxygène pur. Dans tous les cas, on prit la précaution de prévenir toute infection à l'aide de filtres au coton. Les analyses ont compris 10 cultures dans certains cas et 14 dans d'autres. Le résultat fut, encore dans ces conditions, l'absence de transformation.

Le *Sacch. Pastorianus* I fut en outre l'objet d'une série d'expériences où l'on insuffla un courant d'oxygène, comme on l'a décrit ci-dessus, mais cette fois à 32° C. Le choix de cette température força à formuler la question autrement que dans les cas précédents et à se demander si en pareilles circonstances la transformation serait plus prompte et plus énergique. On constata que non.

Ces expériences ont donc toutes établi que, sans élévation de température, l'aération est aussi impuissante à déterminer la transformation que les facteurs ci-devant examinés.

En considérant de plus près les expériences, on voit que la transformation est précédée d'une multiplication; le plus grand nombre de

cellules transformées nous a été fourni par les conditions d'expériences dans lesquelles la multiplication était la plus grande; c'est en effet ce qui ressort clairement de la comparaison entre les expériences faites avec l'eau et celles faites avec le moût. C'est un fait établi depuis longtemps que l'aération joue un rôle important à l'égard de la reproduction; il se peut même qu'elle contribue directement à la transformation en oxydant le protoplasma des cellules. Les expériences mentionnées p. 32 montrent que la transformation avait également lieu dans un liquide abandonné à lui-même, où par conséquent l'aération était moindre que dans les expériences ordinaires. Dans des cultures en moût du *Johannisberg II*, non seulement abandonnées à elles-mêmes à 36°C. , mais dont le liquide n'était pas renouvelé non plus, on vit aussi se former après quelques jours de repos un petit nombre de cellules constamment asporogènes. Il n'est donc pas besoin d'une aération spéciale; mais il n'est pas probable que la transformation puisse avoir lieu, si les cellules sont complètement isolées de tout air.

Dans le but de faire connaître l'effet de l'aération, nous communiquons l'expérience suivante faite avec le *Johannisberg II*. On sema comme d'ordinaire une végétation jeune et vigoureuse à la température de 36°C. Le moût employé venait d'être purgé d'air par ébullition. Une culture fut abandonnée à elle-même à l'abri des agitations; une autre fut agitée deux fois par jour; on les dénomma, en conséquence, culture calme et culture agitée. A 24 heures d'intervalle, on produisit de nouvelles cultures en suivant d'ailleurs les mêmes dispositifs et méthodes que ci-dessus.

Aussi bien dans la 2^e culture que dans la 3^e, par conséquent au bout de 2 et de 3 jours de traitement à haute température, on constata ce que mentionnent les pages 35 et 36, savoir que dans la culture agitée il y avait des cellules transformées un peu plus nombreuses que dans la culture calme; mais cette différence devint plus saillante encore, quand les cellules datèrent d'une culture de trois mois à la température ordinaire. Il s'était alors produit dans quelques-unes des cellules asporogènes une régénération beaucoup plus considérable dans la végétation engendrée sans agitation que dans celle avec agitation. Dans la 2^e culture, le rapport entre les cellules sans spores des deux cultures était alors $\frac{44}{30}$ et dans la 3^e $\frac{109}{64}$, les numérateurs correspondant au contenu des cultures agitées et les dénominateurs à celui des cultures calmes. On constata que, dans les cultures où l'aération était le plus abondante, non seulement la transformation était tout de suite la plus grande, mais encore elle était plus persistante que dans les cultures moins aérées. Un autre essai qui rend encore plus palpable l'action de l'air, sera communiqué dans mon prochain mémoire sur la variation.

Analyse de la 2^e culture agitée.

330 colonies dues
à une ré-
partition
sur géla-
tine au
moût.

Analyse de la 2^e culture calme.

330 colo-
nies dues
à une ré-
partition
sur géla-
tine au
moût.

Analyse de la 3^e culture agitée.

500 colonies dues à une répartition sur gélatine au moût.	300 étaient grandes et donnèrent directement sur bloc de plâtre:	147 végétations sporogènes.			
		153 végétations asporogènes qui, aussitôt après 1 culture en moût, donnèrent:	95 végétations sporogènes.		
			58 végétations asporogènes.	Ces 160 végétations sans spores ayant séjourné 3 mois, puis subi 2 cultures en moût, donnèrent:	51 végétations sporogènes.
			102 végétations asporogènes.		109 végétations asporogènes.
	200 étaient petites et furent aussitôt mises en moût, puis cultivées de la manière ordinaire sur bloc de plâtre, d'où résultèrent:	98 végétations sporogènes.			

Analyse de la 3^e culture calme.

500 colonies dues à une répartition sur gélatine au moût.	324 étaient grandes et donnèrent directement sur bloc de plâtre:	220 végétations sporogènes.			
		104 végétations asporogènes qui, aussitôt après 1 culture en moût, donnèrent:	49 végétations sporogènes.		
			55 végétations asporogènes.	Ces 135 végétations sans spores ayant séjourné 3 mois, puis subi 2 cultures en moût, donnèrent:	71 végétations sporogènes.
			80 végétations asporogènes.		64 végétations asporogènes.
	176 étaient petites et furent aussitôt mises en moût, puis cultivées de la manière ordinaire sur bloc de plâtre, d'où résultèrent:	96 végétations sporogènes.			

Dans ce qui précède, nous avons appris que la transformation des deux espèces n'a pas lieu quand on fait les expériences à la température ordinaire ou à 25°C. , même en satisfaisant à toutes les autres conditions. Il en résulte donc qu'une haute température est nécessaire, si l'on choisit le dispositif d'expériences indiqué. En examinant les résultats des recherches, nous trouvons que c'est là le facteur le plus essentiel. Toutefois, son influence sur le plasma des cellules nous est aussi mal connue que celle des autres facteurs. C'est ici que s'ouvrent de nouvelles questions pour les recherches futures.

Nous allons maintenant étudier les conditions qui concourent à la transformation sur milieu nutritif solide. Les expériences décrites p. 24 et faites sur gélatine au moût, nous montrent qu'il se produit des transformations provisoires dans toutes les espèces qu'on a traitées par ce procédé, mais que les variétés constamment asporogènes ne figurent que dans quelques-unes de ces espèces. Durant ces expériences, la transformation se manifesta dans des circonstances toutes différentes de celles des expériences portant sur les liquides; elle avait lieu aussi bien à la température ordinaire qu'à 25°C. ; l'élévation de la température était inutile et le milieu nutritif ne fut pas renouvelé. Ce dernier point est important pour notre étude. Afin de le rendre encore plus clair, je fis avec le *Johannisberg II*, dont le point de départ est pur, comme les analyses nous l'ont montré, l'expérience ci-dessous. Dans une des séries, le milieu nutritif fut fréquemment renouvelé, des cellules étant transportées d'une culture sur gélatine à une autre, à intervalles rapprochés. Dans l'autre série, on ne fit aucun renouvellement. La première de ces séries ne donna aucune transformation, bien que la reproduction fût très active et que l'aération se fit exactement comme dans la série sans renouvellements. Les cellules de la seconde série ayant séjourné 15 mois sur la même gélatine au moût, la transformation s'était manifestée. Mais alors aussi la gélatine s'était liquéfiée, signe d'apparition de modifications chimiques absentes au début de l'expérience et qui n'ont pas non plus atteint les végétations transportées à courts intervalles sur une nouvelle gélatine nutritive, et par conséquent c'est ici qu'il faut chercher la condition essentielle de la transformation constatée dans ces expériences. La température y joue bien un rôle, mais il se borne à ce que la transformation est plus lente à la température ordinaire qu'à 25°C. D'ailleurs, les biologistes sont assez habitués à voir le même résultat obtenu par des moyens différents.

En quelques-unes des espèces soumises au traitement à la gélatine nutritive tel qu'il a été décrit, on ne constata qu'une transformation

fugace; il faut y ranger le *Sacch. Pastorianus* I. Dans les expériences décrites p. 25, au contraire, cette dernière espèce fut transformée en une variété constamment dépourvue de spores et de voiles, si la culture ayant lieu sur un milieu solide, subit de fréquents renouvellements de ce milieu à 32° et à 34° C. au lieu des basses températures mentionnées. Cela nous montre que même dans les expériences sur milieu nutritif solide, la température élevée peut figurer comme facteur essentiel. On finira probablement par constater la même chose dans des espèces autres que le *Sacch. Pastorianus* I.

Septembre 1900.

Recherches sur les bactéries acétifiantes.

(Troisième mémoire.)

Par

Emil Chr. Hansen.

Le présent mémoire donne communication de nouvelles recherches sur la limite de vitalité et la variation des trois espèces que j'ai décrites. M. Schiønning, attaché au Laboratoire, m'a prêté la main pour les analyses.

Limite de vitalité.

Les premières contributions sous ce rapport ont été communiquées dans mon second mémoire (Compt. rend. du Laborat. Carlsb. III, 210 (1894)) qui décrit également les procédés ainsi que les espèces traitées. Les nouvelles recherches qu'on va présenter, renseignent d'abord sur la vitalité des cellules sur milieux nutritifs tels que bière basse de garde, bière double, sucre de canne dissous (à 10 p. c.) dans l'eau, et eau distillée. On rapporte ensuite les expériences sur la limite de vitalité durant la dessiccation. Ce sont là les phénomènes qui, d'une part, intéressent en particulier le problème de trouver la meilleure méthode de conservation et, d'autre part, nous renseignent sur la vie de la cellule dans la nature.

Bact. aceti.

Dans la bière basse de garde, cette bactérie est restée vivante durant plus de 9 années. Dans la bière double, sa vie a parfois dépassé 6 ans; dans d'autres cas, elle est morte en moins de 5 ans. Dans une solution de saccharose, la limite de sa vitalité était d'environ 2 ans; dans l'eau, elle était autour de 16 mois.

Bact. Pasteurianum.

Dans la bière basse de garde, sa vie a dépassé 10 ans, bien qu'en un cas isolé cette bactérie soit morte au bout de 1 à 2 années.

Dans la bière double, elle a généralement vécu plus de 6 ans; dans un cas, la mort est survenue au bout de 27 mois. Dans une solution de saccharose, la limite de vitalité a été d'environ une année; dans l'eau, cette bactérie est morte au bout de 6 ou 12 mois.

Bact. Kützingianum.

Quelques-unes de ses cultures sont restées en vie dans la bière basse de garde pendant plus de 7 ans, tandis que d'autres ne se conservaient en vie que pendant 5 ans environ. Dans la bière double, sa vie a généralement dépassé 6 ans, bien que certaines cultures l'aient vue succomber après 5 ans d'existence. Dans une solution de saccharose, la limite de vitalité était d'environ une année, et de 9 mois dans l'eau.

En général les trois espèces susdites ont vécu plus de 4 ans dans la bière basse de garde, et de nouvelles expériences m'ont également révélé ce liquide comme le meilleur excipient pour conserver ces cellules. On se rappellera que mon mémoire sur la vitalité des *Saccharomyces* (Compt. rend. du Laborat. Carlsb. IV, 93 (1898)) mentionne la grande importance de la solution de saccharose pour conserver les levures et plusieurs moisissures. L'expérience précédente nous révèle au contraire qu'il n'en est point ainsi des bactéries acétifiantes: elles ne conservent que peu de temps leur vitalité dans ce liquide, et à cet égard l'eau ne leur est pas non plus favorable.

Les expériences rapportées dans mon second mémoire montrent qu'à l'état sec, de jeunes et vigoureuses cellules de *Bact. Pasteurianum* se sont maintenues en vie plus de 4 mois, mais n'ont point dépassé 5 mois. Dans ces expériences, une petite quantité de ces cellules fut placée sur un morceau de fil de platine qu'on introduisit dans un matras Freudenberg vide à la température ordinaire. En répétant cette expérience sur l'espèce susdite, sur le *Bact. aceti* et sur le *Bact. Kützingianum*, j'ai constaté que pour tous les trois la limite de vitalité, en pareilles circonstances, se tient autour de 5 mois, c'est-à-dire précisément le résultat auquel j'étais parvenu antérieurement dans mes essais sur le *Bact. Pasteurianum* seul. C'est également de cette manière que se comportèrent ces espèces quand je tins à 40° C., au lieu de la température ordinaire, les matras contenant les cellules desséchées.

Dans le but de découvrir, si possible, une méthode capable de faire vivre les cellules desséchées plus longtemps que dans les cas précédents, j'ai fait sur les trois espèces les expériences suivantes. Je fis d'abord séjourner à la température ordinaire pendant deux jours les fragments de fil de platine chargés de cellules et introduits dans des

matras Freudenreich, après quoi je les fis passer dans le tube représenté ci-contre (fig. 1 en demi-grandeur) et fermai aussitôt à la lampe ce tube en *a*. Une série de ces tubes fut tenue dans une armoire à l'abri de la lumière et à la température ordinaire, une autre série mise dans le thermostat à 2° C. On constata que pour la première série la limite de vitalité était d'environ 5 mois comme dans les expériences précédentes, tandis que pour la seconde série cette limite dépassait une année. La vie des cellules desséchées a donc été notablement prolongée quand on les a conservées à une basse température: en conséquence on peut appeler le nouveau procédé un progrès. Dans les expériences à la température ordinaire, l'exclusion ou l'admission de l'air n'importait nullement; les cellules qui se trouvaient dans les tubes fermés à la lampe avaient la même limite d'existence que celles enfermées dans les matras Freudenreich des premières expériences décrites. En sera-t-il ainsi à une température inférieure? On ne le voit pas. En tout cas, il est commode de conserver en tubes fermés comme on vient de le mentionner, justement parce que la température est basse; car un long séjour en glacière dans des tubes ou dans des matras où l'air peut pénétrer, expose les cultures à l'attaque du *Penicillium glaucum* et d'autres Moisissures.

Pour voir combien il est important de dessécher avant de fermer les tubes, je fis une expérience spéciale où je fermai les tubes aussitôt après y avoir introduit les fragments de fil de platine chargés des cellules humides. Il en résulta que ces cellules moururent en moins de 5 mois, tant à la température ordinaire qu'à 2° C. Si, dans ces analyses, on passe le tube à la flamme pour en stériliser la surface avant d'ouvrir et de laisser tomber le fil de platine dans un matras contenant un liquide nutritif, il va de soi qu'on doit veiller à ce que les cellules mêmes ne soient pas exposées à une haute température. On y réussit en ne passant par la flamme que la partie du tube située en *a*, fig. 1, et en ouvrant en ce point.

Aujourd'hui qu'on est en voie d'introduire dans la fabrication du vinaigre la culture pure d'espèces et de races choisies, cette industrie, autant que celle de la fermentation alcoolique, est particulièrement intéressée à pouvoir conserver les cellules dans l'état où elles se trouvent à un moment donné. Au reste, touchant la discussion des méthodes de conservation, on voudra bien se reporter au mémoire



Fig. 1.

de 1894, déjà cité, ainsi qu'à mon mémoire paru en 1898 dans le même périodique et traitant de la vitalité des ferments alcooliques.

De la variation.

Mes deux mémoires précédents sur les bactéries acétifiantes contiennent une série de communications sur la variation des cellules et surtout sur leur richesse de formes et sur les facteurs qui y déploient leur activité. Dans mon mémoire de 1894, p. 194, j'ai constaté que c'est la couche gélatineuse des cellules du *Bact. Pasteurianum* et du *Bact. Kützingianum*, à laquelle l'iodure de potassium iodé et certaines autres solutions d'iode font produire la réaction bleue particulière à ces espèces, et, p. 195, j'ai mis en relief l'observation que j'ai faite de l'impuissance où elles arrivent enfin de donner cette réaction, tant dans des liquides que sur milieu solide. Toutefois cette variation était d'un caractère fugace et irrégulier. Après moi, M. Beijerinck a fait une observation analogue¹⁾: il a trouvé qu'une espèce conçue par lui comme *Bact. Pasteurianum* et placée en cultures en stries sur gélatine à la bière, développait certaines cellules dont la couche gélatineuse avait perdu le pouvoir de bleuir par la solution d'iode et qui en restaient là après une culture continue sur un nouveau milieu nutritif. M. Hoyer répéta ces expériences dans le laboratoire de Beijerinck, et arriva au même résultat²⁾. Si, comme les indications de Beijerinck et de Hoyer me le font supposer, la culture sur gélatine à la bière devait toujours être accompagnée d'une pareille variation constante et qu'il y eût là une règle fixe, il y aurait un intérêt spécial à réitérer ces recherches et à les étendre. On disposerait alors d'un procédé commode pour éclaircir des relations importantes de la variation. On ne peut probablement pas imaginer un objet qui se prête mieux à l'analyse. Dans l'espace de quelques minutes on est à même d'étudier, à ce point de vue, plusieurs milliers de végétations. En effet, pour décider si cette variation de la couche gélatineuse a lieu ou non, il suffit de répartir les cellules à la surface d'une gélatine au moult à l'aide d'un pinceau en platine, et quand les colonies développées sont perceptibles à l'œil nu, on verse dessus une solution d'iodure de potassium iodé. Je résolus donc de reprendre mes recherches à ce sujet et surtout de faire un essai sur la gélatine à la bière.

Bien que dans ce qui précède il ait été question seulement du *Bact. Pasteurianum*, je n'en ai pas moins trouvé à propos de faire

¹⁾ Beijerinck, Ueber die Arten der Essigbakterien (Centralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, etc. 2. Abt., IV, 209 (1898)).

²⁾ Hoyer, Études sur les bactéries acétifiantes (Archives néerlandaises des sciences exactes et naturelles [2] II, 190 (1899)).

figurer le *Bact. Kützingianum* dans mes expériences. On plaça les cellules, en cultures en stries, sur des couches épaisses de gélatines telles que gélatine à la bière (soit bière double, soit bière basse de garde), gélatine au moût, gélatine au moût additionnée d'agar-agar et gélatine à l'eau de levure additionnée de saccharose, dont mes mémoires précédents donnent les formules.

Les expériences sur gélatine au moût additionnée d'agar-agar furent faites à 32° — 33° C., et à 25° sur les autres gélatines nutritives. Toutefois on expérimenta aussi, à la température ordinaire, avec le *Bact. Pasteurianum* sur les deux gélatines à la bière. A divers moments, chaque culture subit la répartition sur plaques mentionnée plus haut des échantillons moyens des cellules, puis on examina chaque fois 3—4000 colonies; on avait préalablement fait un essai analogue des points de départ.

La culture du *Bact. Pasteurianum* fut poursuivie durant une année. A la clôture des expériences, cette espèce donna bien dans tous les cas quelques cellules dont la couche gélatineuse avait temporairement perdu le pouvoir de produire la substance qui donne la réaction bleue par les solutions d'iode; mais, cultivées en bière double, ces cellules revinrent promptement à l'état normal. Bref, c'était là concorder parfaitement avec mes observations antérieures.

Les expériences avec le *Bact. Kützingianum* furent faites de la même manière que pour le *Bact. Pasteurianum*, excepté toutefois la température ordinaire, et je les interrompis au bout d'environ 8 mois. Ici aussi, ce fut dans toutes les cultures qu'on constata la transformation temporaire des cellules. La transformation constante d'un petit nombre de cellules fut constatée dans des végétations sur gélatine au moût à 25° C., sur gélatine au moût additionnée d'agar-agar à 32° — 33° C. et sur gélatine à la bière basse de garde à 25° C. La majeure partie des cellules n'était pas transformée, et là aussi on constata une grande irrégularité. En répétant ce genre d'expériences, j'ai trouvé, dans quelques cas, des cellules à transformation constante; dans d'autres, je n'en ai pas trouvé. Par cellules constamment transformées j'entends, ici comme dans la suite, celles qui ne donnèrent pas la susdite réaction bleue et qui persistèrent dans cet état durant toute une année encore, bien que cultivées dans des conditions favorables. Nous employons le terme transformation pour mieux nous exprimer sur cet état de choses. La transformation est-elle réelle ou non? C'est ce que l'irrégularité des résultats ne permet pas de décider.

Dans les nouvelles expériences sur les gélatines nutritives, le *Bact. Pasteurianum* ne subit donc, comme antérieurement, qu'une transformation purement provisoire, et les indications de Beijerinck

et de Hoyer n'ont pas été confirmées. Selon toute probabilité, ils n'ont pas opéré sur cette bactérie: c'est plutôt sur le *Bact. Kützingianum* ou telle autre espèce qui s'en rapproche; mais, comme nous l'avons vu, ce n'est pas non plus pour le *Bact. Kützingianum* que la culture sur gélatine à la bière ou autres gélatines fournit un procédé certain pour déterminer une variation fixe et héréditaire.

Dans les cultures en bière qui avaient séjourné longtemps, j'ai également pu constater de temps à autre la présence de certaines cellules ayant perdu, au moins pour un temps, le pouvoir de donner la réaction bleue; mais je ne découvris pas plus de règle ici que dans les cas précédents. Dans ces cultures, le *Bact. Pasteurianum* s'est comporté de la même manière que le *Bact. Kützingianum*.

De ses observations sur la couche gélatineuse, Beijerinck conclut que le *Bact. Pasteurianum* doit plutôt être considéré comme variété d'un des types dont la couche gélatineuse ne donne pas la réaction bleue décrite, et il classe de même l'espèce décrite par moi sous le nom de *Bact. aceti*, ainsi que les deux espèces de Henneberg, savoir le *Bact. oxydans* et le *Bact. acetosum*; il les comprend dans la catégorie de l'espèce établie par lui, *Bact. rancens*.

Comme on le sait, il arrive généralement, même aux plantes supérieures, qu'un de leurs caractères peut disparaître; il n'y a donc aucune raison de remanier ainsi la classification des bactéries acétifiantes; en outre, le *Bact. Pasteurianum* se distingue des espèces en question par plusieurs caractères autres que le précité, et aucune de ces espèces n'est capable de produire la couche gélatineuse qui bleuit par la solution d'iode. Ce caractère est en somme un des meilleurs que nous connaissions aux bactéries; il a un haut degré de constance, ainsi que l'ont montré les expériences décrites antérieurement. Beijerinck maintient provisoirement en qualité de „fait reconnu par tout le monde“ l'espèce *Bact. Pasteurianum*; mais, selon lui, c'est une erreur qui devrait bien être rectifiée, et mon espèce devrait être remplacée par la nouvelle espèce qu'il a décrite. Les objections qu'il fait à l'adoption de l'espèce *Bact. Kützingianum* sont d'une teneur si générale, qu'il n'y a pas à les discuter. D'ailleurs, cette même espèce est aussi reconnue par les spécialistes compétents: elle est, à l'instar de la précédente, établie non sur un seul caractère, mais sur plusieurs, et ces caractères ne se bornent pas à un seul mode de culture déterminé. MM. Henneberg et Seifert ont ajouté de nouveaux caractères distinctifs à ceux que j'ai marqués pour différencier ces deux espèces.

Voici ce que Beijerinck dit de l'espèce que j'ai décrite sous le nom de *Bact. aceti*: „M. Hansen commet la même erreur que

M. Brown en dénommant cette espèce Bact. aceti. Ni Hansen ni Brown n'ont aucune connaissance du Bact. aceti, Pasteur⁴. Cette manière de parler aussi est peu claire. La désignation spécifique aceti n'est point due à Pasteur, comme Beijerinck semble le supposer, mais à Kützing, et je l'ai adoptée parce qu'elle avait déjà cours dans les livres. Elle représentait alors les bactéries acétifiantes en général et non pas une unité systématique et définie. Pasteur s'est procuré des semences pour ses essais en exposant à l'action de l'air des liquides composés d'eau, de vinaigre, d'alcool, de bière ou de vin. Dans les différentes expériences qu'il a faites de la sorte, il devait obtenir tantôt une espèce, tantôt une autre et parfois un mélange de plusieurs. Des expressions de Beijerinck, p. 215, il ressort que lui aussi a réellement vu les choses ainsi. En effet, il y admet que, „par hasard et sans le savoir“, Pasteur ait eu plusieurs espèces dans ses cultures. En somme, c'est peine perdue que de demander, soit à Pasteur, soit à d'autres auteurs de ce temps-là, de quelles espèces ils ont voulu parler. Beijerinck mentionne plus tard une espèce qu'il dénomme „Schnellessigbakterie“, ayant une tendance à former voile sur un liquide nutritif composé de l'eau ordinaire des conduits, d'alcool, de phosphate d'ammoniaque et de chlorure de potassium. Partant de l'idée que ce liquide a la même composition que celui employé dans le temps dans quelques-unes des expériences de Pasteur, il veut y voir une base pour établir que cette „Schnellessigbakterie“ non seulement est le vrai Bact. aceti, mais appartient en même temps à l'espèce sur laquelle Pasteur a opéré. Il en vient à contredire en masse ce qu'il a dit plus haut. Et ce liquide nutritif artificiel! C'est bien en cela que le liquide de Beijerinck est tout différent de celui de Pasteur. La cause en est, non seulement que Beijerinck emploie l'eau ordinaire des conduits, ce qui fait qu'en réalité la solution devient, comme milieu nutritif pour bactéries, d'une composition chimique très variable, mais, à d'autres égards encore, il y a de fortes divergences. En effet, le liquide nutritif artificiel employé par Pasteur avait la composition que voici: acide acétique cristallisable, alcool absolu, phosphate d'ammoniaque, phosphate de magnésie, phosphate de potasse, phosphate de chaux et eau distillée. Ces raisons suffisent pour rendre inadmissibles les conclusions tirées par Beijerinck. A cela s'ajoute ce fait établi par mes recherches, qu'on trouve plusieurs espèces de bactéries acétifiantes, entre autres aussi des bactéries typiques de la bière, capables de croître dans des liquides artificiels comme les précités, ainsi que le fait que telles bactéries préfèrent un de ces liquides et que d'autres bactéries veulent d'autres de ces liquides.

Outre les variations mentionnées, on peut encore faire ressortir

ici qu'un long séjour dans la culture en bière met les espèces en état de développer des cellules qui ont plus ou moins complètement perdu le pouvoir de former des voiles et ces longs chapelets d'articles courts; mais la formation de voiles est un des caractères sur lesquels Beijerinck compte spécialement pour appuyer sa classification des espèces, tandis qu'il n'attache aucune importance à ce phénomène morphologique capital de la présence ou de l'absence de cils dans les espèces. Elle aussi, la composition chimique des zooglées du *Bact. xylinum* peut varier de manière à ne plus donner la réaction de la cellulose. Pour être conséquent, Beijerinck aurait donc dû rejeter cette espèce, elle aussi, et pourtant il n'en fait rien; bien mieux, il devrait rejeter également les espèces qu'il a lui-même établies; car elles varient toutes dans les caractères qu'il met en relief. Cela suffira pour montrer quelles objections on peut élever contre les tentatives systématiques de Beijerinck.

Pour le moment c'est à l'analyse qu'il faut attacher de l'importance; jusqu'à nouvel ordre, la question de savoir s'il faut regarder les unités systématiques trouvées ou comme espèces, ou comme variétés, présente peu d'intérêt. L'investigateur, il est vrai, doit s'attendre à des difficultés à propos de la variation; mais elles ne sont ni plus grandes ni d'autre nature que quand il s'agit d'autres groupes de bactéries.

Septembre 1900.

Phénomènes d'accroissement perforant et de formation anormale des conidies chez le *Dematium pullulans*, de Bary, et autres Champignons.

Par

Alb. Klöcker et H. Schiönning.

Il y a quelques années, M. Alfred Jörgensen¹⁾ publia une communication sur certains corpuscules trouvés dans les cellules du *Dematium pullulans*, de Bary; peu après, M. Weleminsky²⁾ publia un mémoire sur le même sujet. Ces deux auteurs voyaient dans les corpuscules en question de véritables endospores. Depuis longtemps déjà nous avons fait des observations analogues qui nous avaient amenés à un tout autre résultat que celui de Jörgensen et de Weleminsky concernant la valeur morphologique de ces corpuscules; en conséquence, nous publiâmes une communication provisoire³⁾ dans laquelle nous montrâmes que les susdits corps sont, non pas des endospores, mais bien des conidies de formation anormale. En outre nous fîmes voir que cette même formation anormale de conidies a également lieu chez l'*Oïdium lactis*, Fresenius. Nous promîmes de traiter explicitement dans le Compte rendu présent le susdit état de choses et d'en donner des illustrations. C'est cette promesse que nous tenons aujourd'hui.

Les phénomènes d'accroissement perforant⁴⁾ ont été assez fré-

¹⁾ Alfred Jörgensen, Die Hefenfrage (Centralbl. f. Bakt. Par. u. Inf., 2. Abth. IV, 860 (1898)).

²⁾ Friedrich Weleminsky, Ueber Sporenbildung bei *Dematium pullulans*, de Bary (Ibid. V. 297 (1899)).

³⁾ Alb. Klöcker und H. Schiönning, Ueber Durchwachsungen bei *Dematium pullulans*, De Bary und bei anderen Pilzen (Ibid. V, 505 (1899)).

⁴⁾ Strictement parlant ce n'est pas toujours d'un accroissement perforant (Durchwachsung) qu'il s'agit; souvent ce n'est que d'une invasion. Si généralement nous employons le terme „accroissement perforant“, c'est parce que les savants (tels que Lindner, par exemple) s'en sont servis jusqu'ici dans tous les cas.

quemment observés dans le règne végétal, aussi bien dans les types inférieurs que dans les supérieurs. En ce qui concerne spécialement les Champignons, les observations de M. Schleiden¹⁾ sont les premières dans ce sens, savoir à propos de l'*Achlya prolifera*. Voici ce qu'il en dit (*l. c.*, pp. 227—28): Un article filiforme terminal des hyphes où il s'est produit de petites spores, s'étant vidé, la cloison contiguë y en pousse généralement un nouveau qu'elle vient de former. Pringsheim²⁾ dit avoir constaté chez le *Saprolegnia ferax* qu'un hyphe peut pénétrer en croissant dans un sporange évacué et y former un oogone (*l. c.*, p. 197, pl. XVIII, fig. 5). Dans la variété *hypogyna* de cette même espèce, il a observé qu'en croissant les anthéridies pénètrent à travers la cloison dans les oogones (*l. c.*, p. 196, pl. XVIII, fig. 9 et fig. 10). Dans sa monographie du genre *Chætomium*, Zopf³⁾ décrit et représente des chlamydospores du *Ch. Kunzeanum*, qui germent pendant qu'elles font encore partie du mycélium, après quoi les tubes germinatifs croissent à travers les cloisons transversales des cellules voisines (*l. c.*, p. 243, pl. 3 (XVI), figg. 24, 25 A, 25 B). Chez l'*Inzengaea erythrospora*, Borzi⁴⁾ constata que certaines cellules terminales vésiculaires de l'extrême couche corticale du péri-thécium, étaient traversées par les hyphes en voie de croissance qui les portaient (*l. c.*, p. 456, pl. XX, fig. 12). Parmi ses illustrations de l'*Endomyces Magnusii*, Ludwig⁵⁾ en donne une qui montre qu'elle aussi, cette espèce figure avec des conidies endogènes (*l. c.*, p. XXIII, pl. XVIII, fig. 7). Toutefois, c'est Lindner⁶⁾ qui a le plus approfondi la question: il décrit et figure amplement quelques phénomènes d'accroissement perforant des *Epicoccum purpurascens*, *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*. Dans la première de ces espèces il constata différentes sortes du phénomène en question, et il observa souvent qu'à l'instar du *Chætomium* de Zopf, les chlamydospores germaient avant d'avoir quitté le mycélium. Quelquefois, mais rarement, elles présen-

¹⁾ Schleiden, Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik. 4. Aufl. Leipzig, 1861.

²⁾ N. Pringsheim, Weitere Nachträge zur Morphologie und Systematik der Saprolegniaceen (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot. IX, 191 (1873—74)).

³⁾ W. Zopf, Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten. *Chaetomium*. (Nova Acta d. Ksl. Leop.-Carol. Deutschen Akad. d. Naturf. XLII, 199 (1881)).

⁴⁾ A. Borzi, *Inzengaea*, ein neuer Askomycet (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot. XVI, 450 (1885)).

⁵⁾ I. F. Ludwig, Ueber Alkoholgährung und Schleimfluss lebender Bäume und deren Urheber (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. IV, 17 (1886)).

⁶⁾ Paul Lindner, Ueber Durchwachsungen an Pilzmycelien (Ibid. V, 153 (1887)).

taient ce que Borzi a vu dans l'*Inzengæa* (*l. c.*, p. 158, pl. VII, fig. 10). En fig. 3 et en fig. 6, Lindner représente une cellule qui en croissant pénètre dans un filament de mycélium autre que celui dont il forme un article. En fig. 5 et en fig. 7, cet auteur montre des accroissements perforants d'*Alternaria*. Sur ce qui a lieu chez le *Botrytis cinerea*, Lindner s'exprime ainsi: „Chez le *Botrytis cinerea*, les accroissements perforants ne sont pas rares, surtout quand le mycélium est un peu vieux. Ici aussi¹⁾ le plasma se répartit diversement, et il en résulte que certaines cellules ont un contenu très abondant, tandis que d'autres sont complètement évacuées. L'apparition des accroissements perforants se relie de près au fait que les cellules qui germent à l'inté-

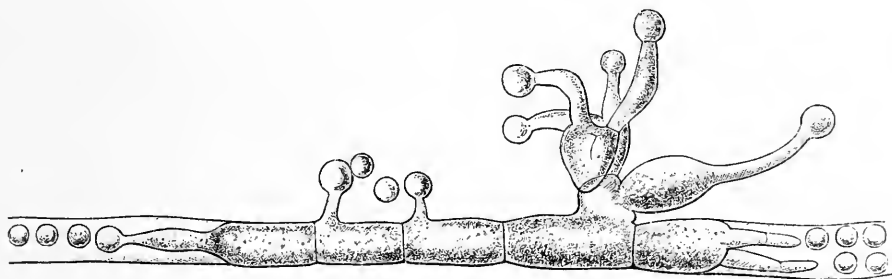


Fig. 1. *Botrytis cinerea*, Pers.

Phénomène d'accroissement perforant; formation de petites conidies (spermaties) à l'intérieur d'une cellule. (D'après P. Lindner).

rieur du vieux mycélium, sont presque exclusivement celles où abonde le protoplasma.“ Ceci est tout à fait identique à ce que nous avons constaté chez le *Dematium*, et nous y reviendrons plus tard.

Parmi les figures de Lindner, la 13^e de la planche VII offre un intérêt particulier; aussi l'a-t-on reproduite ci-dessus. Elle montre comment, à l'intérieur d'une cellule mycélienne, pousse un stérigme qui détache de petites conidies (spermaties). Chez l'*Endomyces Magnusii*, Brefeld²⁾ a observé des „Oïdiums endogènes“, et il en a donné une représentation (*l. c.*, p. 131, pl. I, fig. 7). Cet auteur mentionne et décrit une autre espèce des formations anormales en question de l'*Ascoidea rubescens* (*l. c.*, p. 102, pl. III B, figg. 15—19; 21—23; 25): ici, c'est la branche sporifère qui pousse dans l'ancien sporange avant que ce dernier ait évacué sa masse de spores. Un état de choses à peu près analogue à ce dernier a été constaté par M. Alb.

¹⁾ Lindner a constaté ce même fait dans l'*Epicoccum* et l'*Alternaria*.

²⁾ Oscar Brefeld, Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. IX. Münster i. W., 1891.

Schmidt¹⁾ chez le *Sterigmatocystis nidulans*, dont le mycélium peut pénétrer en croissant dans une chlamydospore (*l. c.*, p. 21, figg. 25 et 26) et M. Holtermann²⁾ a fait la même observation sur l'*Ascoidea saprolegnioides*, où, à l'instar de la susdite espèce d'*Ascoidea*, la branche sporifère pénètre dans le sporange évacué, et y forme un nouveau sporange ou bien y détache des conidies (*l. c.*, p. 19, pl. II, figg. 14 b; 17—19; 21—25). Il a également constaté dans cette même espèce (*l. c.*, p. 21, pl. II, figg. 15 et 16) la formation, en cellules mycéliennes, de conidies endogènes, identiques d'aspect avec celles que nous avons observées dans le *Dematium*.

Ce qui précède constitue le contingent de la littérature à propos des phénomènes d'accroissement perforant dans les Champignons, et nous montre l'extension de ces formations: nous les trouvons chez les Saprolegniacées, les Ascoïdées et dans toute une série d'Ascomycètes, ainsi que dans divers Fungi imperfecti, et l'on ne peut guère douter qu'ils ne se retrouvent dans beaucoup d'autres Champignons. Leur nature a été plus ou moins mal comprise par plusieurs auteurs, et ces phénomènes méritent assurément plus d'attention qu'on ne leur en a accordé jusqu'ici.

Nous allons maintenant parler de nos propres recherches sur le *Dematium pullulans*, de Bary, l'*Oïdium lactis*, Fresenius, et une autre espèce d'*Oïdium* non encore décrite.

Pour nos expériences sur le *Dematium* nous avons pris différentes végétations typiques que, de temps à autre, nous avons isolées de divers fruits, et nous avons réussi à produire en toutes ces végétations les formations anormales en question.

Voici l'allure du phénomène: une cellule mycélienne, vigoureuse et pleine de plasma, se comporte comme parasite vis-à-vis de sa voisine plus faible, car, par voie de bourgeonnement, elle détache, de son extrémité tournée vers la cellule faible, des conidies qui par conséquent en arrivent à occuper l'intérieur de cette cellule affaiblie. Ainsi qu'on le voit, les choses se passent ici exactement comme le rapporte Lindner à propos du *Botrytis cinerea*. Ces conidies endogènes ainsi formées doivent donc leur origine, non pas à la cellule où elles apparaissent, mais bien à la cellule voisine.

1) Alb. Schmidt, Ueber die Bedingungen der Conidien-, Gemmen- und Schlauchfruchtproduktion bei *Sterigmatocystis nidulans*. Eid. Inaugural-Dissert. Halle a/S. 1897.

2) Carl Holtermann, Mykologische Untersuchungen aus den Tropen. Berlin, 1898.

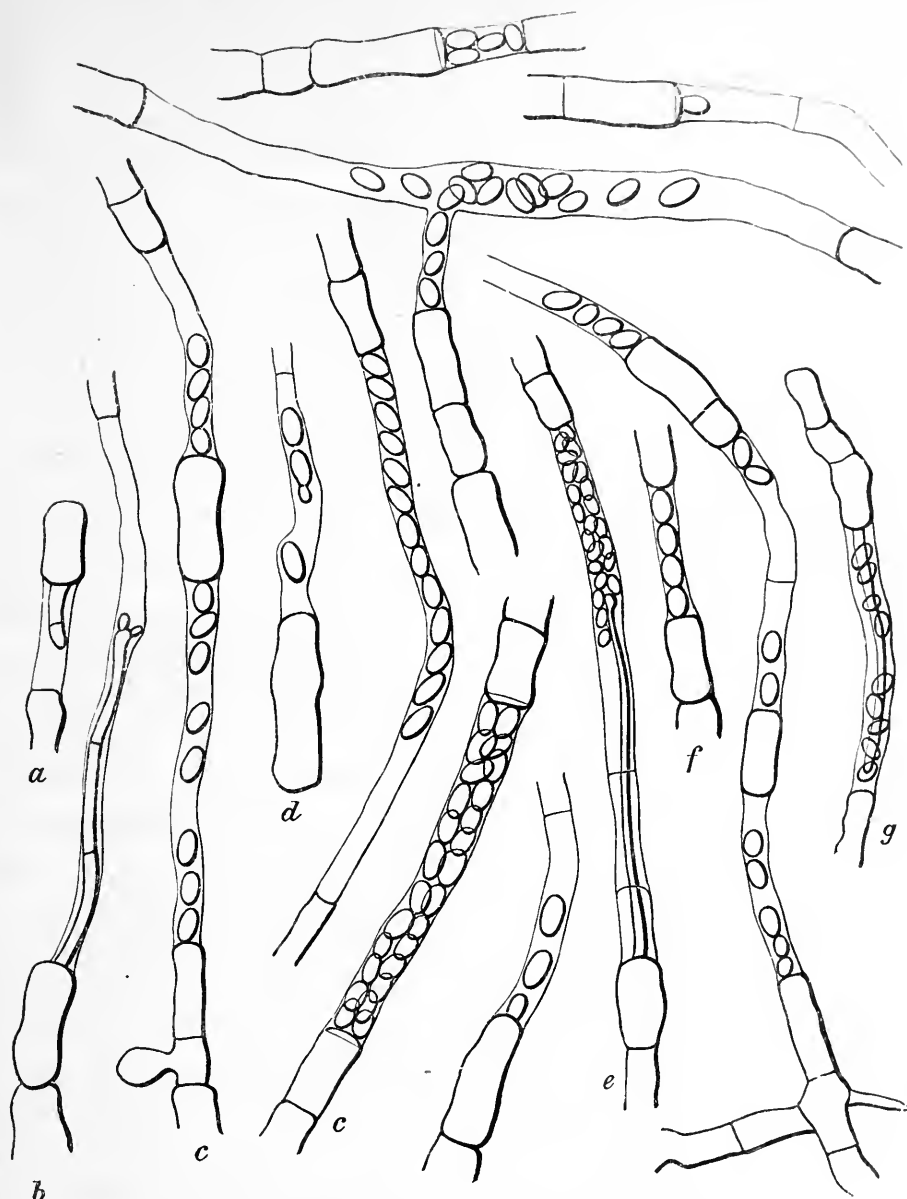


Fig. 2. *Dematium pullulans*, de Bary.

Phénomènes d'accroissement perforant et formation de conidies endogènes; *a* et *b* sont des filaments mycéliens pénétrés par la formation; en *b*, ce filament détache des conidies; *c* représente l'évolution des conidies, d'une part aux deux bouts d'une même cellule, d'autre part, celle de conidies émanant de deux cellules et pénétrant dans le même morceau de mycélium; *d*, conidie endogène en voie de détacher un bourgeon; *e*, filament de mycélium qui a perforé les cloisons de deux cellules; *f*, cellule à 4 conidies; elle ressemblait particulièrement à un sporange à 4 spores; *g* montre comment une des cellules a émis un filament de mycélium dans la cellule voisine, et une autre cellule détaché des conidies; *e* a été observé, à la température ordinaire, dans une culture en eau et datant d'un mois; toutes les autres cultures en eau, datant de 1 à 2 jours, à la température de 20° et de 25° C. Grossissement linéaire de 500 fois.

La fig. 2 ci-dessus donne plusieurs exemples d'une pareille formation de conidies endogènes. Quelques-unes des figures ont été dessinées

directement d'après l'objet préparé; d'autres d'après des photographies de préparations. Il arrive parfois que la cellule forte pousse dans la plus faible un filament mycélien plus ou moins long (fig. 2, *a, b, e, g*). Ce filament peut alors détacher des conidies (fig. 2, *b*), bien que ce cas soit assez rare. Elles aussi, les conidies logées à l'intérieur de la cellule peuvent se multiplier par bourgeonnement (fig. 2, *d*), mais ce cas aussi est moins fréquent. Si chaque extrémité d'une cellule faible est flanquée d'une cellule plus vigoureuse, ces deux cellules plus fortes peuvent envahir leur faible voisine et y détacher des conidies (fig. 2, *c*), ou bien l'une y fait entrer un filament de mycélium et l'autre y fait détacher des conidies (fig. 2, *g*). Quelquefois on peut voir les conidies pousser devant elles le peu de protoplasma contenu dans la cellule faible. L'extrémité de laquelle la cellule vigoureuse émet ses nouvelles formations, pénètre généralement sous forme de voûte dans la cellule faible. (On voit plusieurs cellules en fig. 2.) Le nombre des conidies endogènes formées de la sorte est très variable: nous en avons compté de 1 à 65 dans une cellule. Si ce nombre est petit et que les cellules soient toutes de même forme et de mêmes dimensions, on peut expliquer qu'elles se confondent avec un sporange (voir, par exemple, fig. 2, *f*), quand l'étude se borne à l'examen direct du microscope et qu'on ne poursuit pas la marche de l'évolution. Mais souvent elles varient de grandeur, et les plus récentes surtout sont les plus petites.

Ce qui précède fait déjà ressortir nettement et clairement qu'il ne s'agit point ici d'une formation d'endospores, mais bien d'une formation anormale de conidies par suite d'accroissement perforant. Toutefois nous ne nous sommes pas contentés des susdites observations, mais nous avons poursuivi l'évolution des conidies sous le microscope. C'est surtout par là que pêche le travail de Weleminsky, car il n'a pas appliqué cette méthode de recherches, qui pourtant est la seule à même de donner l'intelligence du phénomène.

Afin de pouvoir étudier l'évolution des conidies endogènes, il fallait cependant avoir une méthode capable de produire à coup sûr et avec précision le phénomène. Et c'est encore là qu'on perd son temps à chercher cette méthode dans le mémoire de Weleminsky. Veut-on produire lesdites formations, tant celles du *Dematium* que celles de l'*Oïdium*, on doit semer dans un matras Freudenreich contenant de 5 à 6 gouttes d'eau distillée stérile un peu de mycélium jeune et vigoureux, engendré par ex. dans du moût à 25° C. en un ou deux jours; on a lavé préalablement ce mycélium en l'agitant pendant quelques minutes dans environ 10^{cc} d'eau distillée stérile. Puis on place la culture à 25° C. ou à la température ordinaire. Alors, au

bout de un ou de deux jours, on constate les phénomènes en question. Ces cultures sont le point d'origine de toutes les formations reproduites en fig. 2, à l'exception de *e*, qui provient d'une pareille culture en eau, mais qui avait séjourné environ un mois à la température ordinaire. C'est peut-être à la longueur de ce séjour qu'il faut attribuer la perforation de deux cloisons par le filament de mycélium intrus.

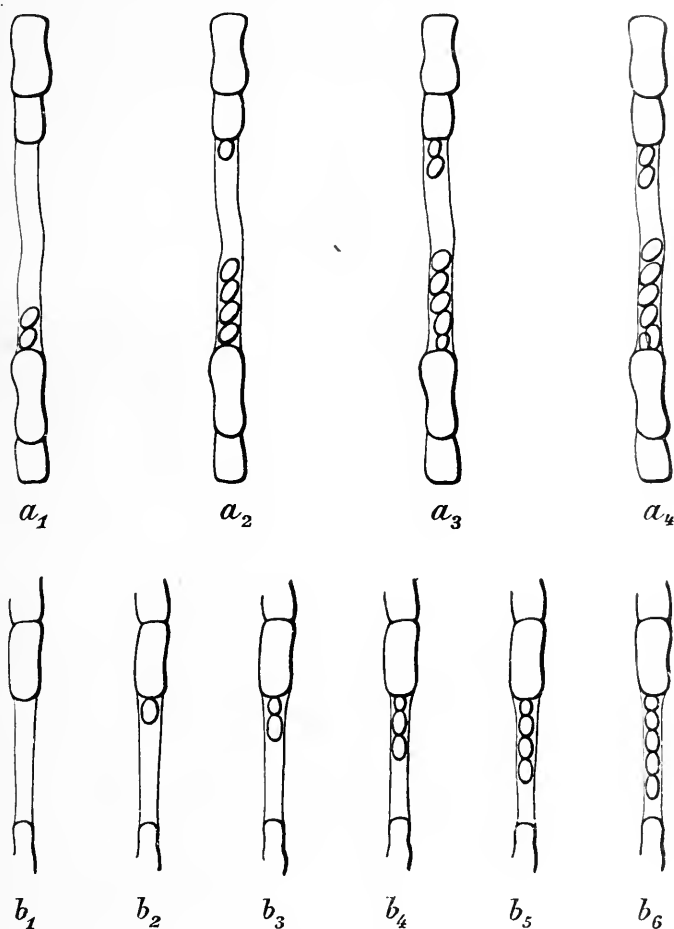


Fig. 3. *Dematium pullulans*, de Bary.

Deux séries d'évolutions de conidies endogènes, observées, dans des préparations, sous lamelle couvre-objet, de cultures en eau; *a*-série, évoluée en 5 heures, et *b* en 24 heures à 20° C. Grossissement linéaire de 500 fois.

Voici comment nous avons conduit l'étude directe au microscope. Ayant fait une culture en eau dans un matras Freudenberg à 20° C. et d'après la méthode ci-dessus décrite, nous y prélevâmes, au bout de 24 heures, une très minime quantité du mycélium et nous la plaçâmes, dans une goutte d'eau stérile, sur un verre porte-objet stérilisé, qui fut recouvert d'une lamelle couvre-objet stérilisée. Cette préparation fut alors introduite avec précaution sous le microscope, et l'on observa pas mal de conidies endogènes. Nous visâmes une cellule située sur le

bord d'une pelote de mycélium et où le phénomène ne faisait que de commencer, comme, par exemple, en a_1 de la fig. 3, où deux conidies venaient de se former. Cette cellule fut dessinée et repérée dans la préparation de manière à pouvoir être retrouvée. En même temps on fit un croquis de quelques-uns des filaments de mycélium situés dans le voisinage, là où une cellule vigoureuse et pleine de plasma était bordée d'une cellule faible et évacuée, ayant des chances pour être le lieu de production de conidies endogènes. La préparation fut ensuite placée sur une étagère sous une cloche à parois humides à la

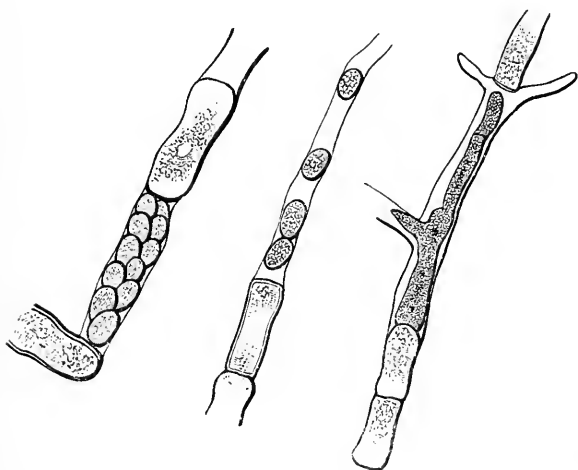


Fig. 4. *Dematium pullulans*, de Bary. Conidies endogènes et filament de mycélium, le tout d'un vert brun, provenant d'une culture en eau à la température ordinaire, datant d'environ un mois. Grossissement linéaire de 500 fois.

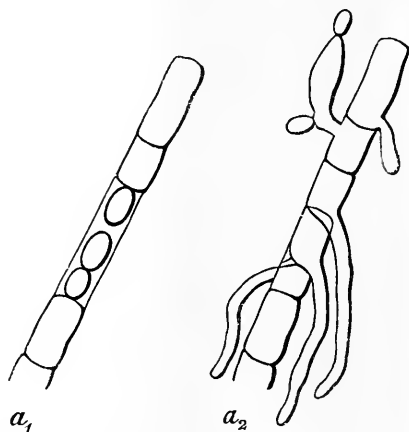


Fig. 5. *Dematium pullulans*, de Bary. Germination, en moût, de conidies endogènes dans une préparation sous lamelle couvree-objet. Au bout de 24 heures, les conidies (a_1) ont gonflé et émis des tubes germinatifs (a_2); il en est de même des deux cellules situées au haut du filament de mycélium. Grossissement linéaire de 500 fois.

température ordinaire, et on l'observa à intervalles fixes. A titre d'exemple, nous poursuivîmes l'évolution des deux séries reproduites ci-dessus en fig. 3. La série *a* eut terminé en 5 heures, mais il fallut 24 heures à la série *b*. Nous vîmes comment les conidies se détachaient des cellules vigoureuses et comment les premières conidies formées étaient poussées en avant par les plus récentes.

Bien qu'on ne puisse pas s'y méprendre en concluant de tout ce qui précède, qu'il s'agit ici de conidies et non d'endospores, nous insisterons cependant en ajoutant que, même à d'autres égards, les conidies endogènes sont tout à fait identiques aux conidies de formation normale.

On sait que ces dernières se pigmentent en vieillissant et il en est de même de celles de formation endogène. La fig. 4 présente quelques-

unes de ces conidies endogènes d'un brun verdâtre, ainsi qu'un filament de mycélium endogène et de cette couleur. Ces préparations proviennent d'une culture en eau, vieille d'un mois environ et faite à la température ordinaire. Avec l'âge, les conidies endogènes prennent aussi des parois plus épaisses, tout comme les conidies normales, qui germent, comme on le sait, non seulement par voie de bourgeonnement, mais encore à l'aide de tubes germinatifs. Ce même mode se retrouva chez les conidies endogènes; on a déjà mentionné leur bourgeonnement. La fig. 5 est l'image d'une cellule à trois conidies endogènes (a_1). Dans l'espace de 24 heures, on l'examina au microscope après l'avoir ensemencée dans du moût sur un verre porte-objet stérile, et nous vîmes alors comment ces trois conidies germaient à l'aide de tubes germinatifs traversant la paroi de la cellule qui les contenait (a_2). Nous suivîmes pour cela le même procédé qu'en observant l'évolution des conidies. On constata que les conidies les plus approchées du bord de la lamelle couvre-objet et dont, par conséquent, l'air avait largement l'accès, germaient dans le courant des premières 24 heures, en se mettant à enfler de façon à combler presque le filament de mycélium tout entier qui les contenait. Ensuite elles émirent des tubes germinatifs, de la même manière que des conidies de formation normale qui se trouvaient dans la préparation.

Si l'on transporte dans du moût un mycélium contenant les susdites formations anormales de conidies, il ne se produit, comme on devait s'y attendre, aucune fermentation, mais la simple évolution d'une végétation de *Dematium* normale et typique. Une évolution analogue a lieu sur la gélatine au moût.

En ce qui concerne les conditions de production du phénomène considéré, il est difficile de pousser plus loin les recherches à ce sujet; car l'état des choses est fort compliqué, vu qu'il s'agit précisément d'une lutte entre des cellules contiguës, non seulement à propos de la nourriture qui les entoure, mais en même temps pour la prédominance d'une cellule sur l'autre. Parmi les causes probables, nous pouvons avancer que les susdits phénomènes doivent tout d'abord leur apparition à une alimentation insuffisante. En effet, nous avons constaté qu'ils se produisaient toujours quand on employait, pour expérimenter, l'eau seulement; la fréquence existait encore, si l'eau ne contenait la nourriture qu'en faible quantité (par exemple, lorsque le mycélium était tiré de la culture en moût et n'était point lavé); mais le phénomène était d'une extrême rareté pour peu que l'ensemencement eût lieu en quelques gouttes de moût dans un matras Freudenberg, c'est-à-dire dans un liquide nutritif favorable. Il y a encore une condition, c'est que le mycélium semé doit être jeune et vigoureux,

et la dernière est qu'il faut laisser l'air affluer abondamment. Plus on met d'eau dans le matras Freudenreich, plus les formations anormales en question éprouvent de difficultés à se produire. Sur les blocs de plâtre humides, ces formations eurent lieu très irrégulièrement: nous ne les avons trouvées en abondance qu'une seule fois; en d'autres cas, elles firent tout à fait défaut malgré l'identité des circonstances.

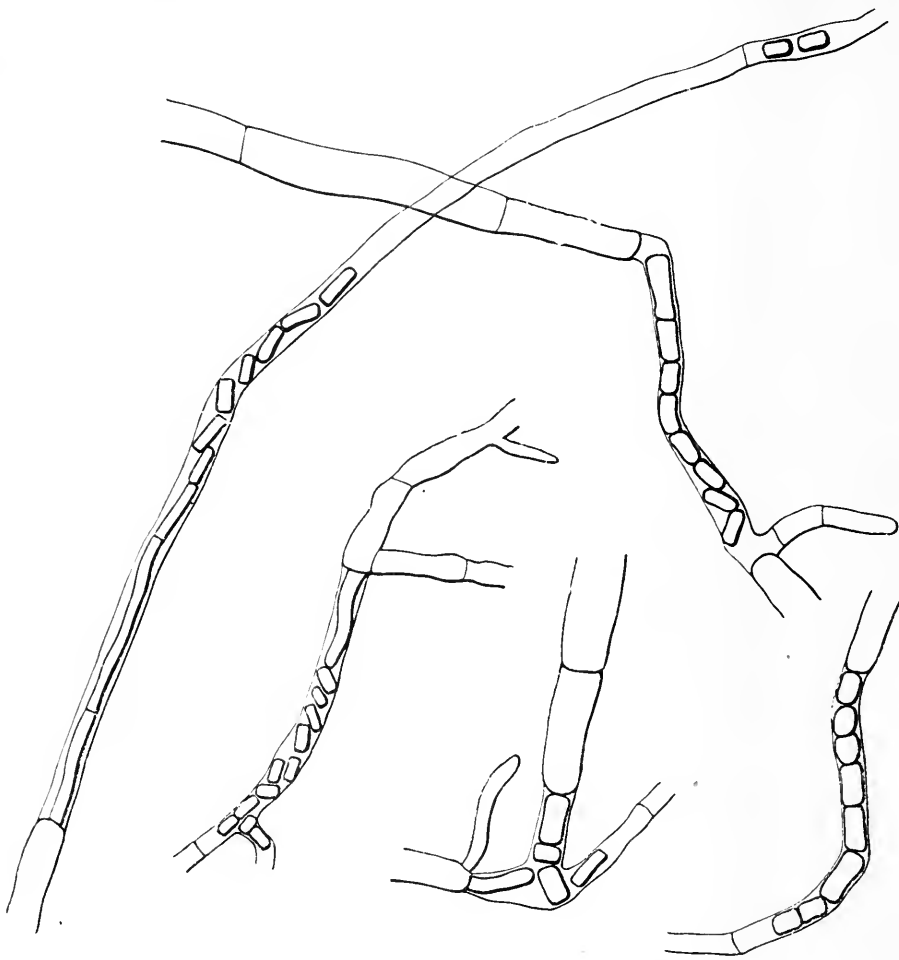


Fig.6. *Oidium lactis*, Fresenius.

Phénomènes d'accroissement perforant et formation de conidies endogènes.
Grossissement linéaire de 500 fois.

Dans les cultures en eau en chambres Ranvier avec ou sans ventilation, ainsi que dans les chambres Böttcher, l'apparition était rare ou nulle.

Quant à l'influence de la température, nous n'avons rien constaté de régulier en opérant à 15°, 20°, 25° et 30° C., et l'évolution semble avoir lieu aussi vite à 15° qu'à 30°. Les conidies peuvent surgir rapidement, comme le prouve l'expérience dans laquelle, au bout de 5 heures, nous constatons déjà leur présence à 20° C.

Là où Weleminsky trouva le plus souvent les conidies endogènes, ce fut dans des chambres où les cultures furent desséchées, puis ré-

humectées. La plupart du temps, ce n'étaient que les premières générations de son ensemencement qui donnaient ce phénomène, que notre procédé, au contraire, nous permet de produire n'importe quand.

Ce même phénomène d'accroissement perforant que nous avons constaté chez le *Dematium pullulans* et décrit dans ce qui précède, nous l'avons également découvert chez l'*Oïdium lactis*, Fresenius et dans une autre espèce d'*Oïdium*. Chez l'*Oïdium*, la formation de conidies endogènes a lieu exactement de la même manière que chez le *Dematium* et dans des conditions tout à fait identiques. Dans la fig. 6 ci-dessus, on voit cette formation dans une culture en eau, vieille de 48 heures et à 25° C.

Nos recherches ont donc pour résultat que les phénomènes d'accroissement perforant ont fréquemment lieu chez le *Dematium pullulans*, de Bary et dans certaines espèces d'*Oïdium*, comme cela arrive chez tant d'autres Champignons; il se forme alors des conidies à l'intérieur de certaines cellules, et les conditions pour la formation de ces conidies est que l'alimentation soit mauvaise, l'humidité très abondante et l'air aussi. Weleminsky a donc tort de voir de vraies endospores dans ces corpuscules-là et de prétendre qu'en conséquence le *Dematium pullulans* devra désormais être compté parmi les Ascomycètes et rangé près des *Saccharomyces* et *Exoascus*. Le *Dematium pullulans* doit, comme ci-devant, être rapporté aux *Fungi imperfecti*. Nous n'avons pas mieux réussi que Weleminsky à découvrir une relation génétique entre le *Saccharomyces* et le *Dematium*.

Septembre 1900.

La formation d'enzymes dans les ferments alcooliques peut-elle servir à caractériser l'espèce?

Par

Alb. Klöcker.

Dans un mémoire intitulé *De la fermentation des saccharides* (voir *Compt. rend.* CXXVIII, 440 (1899)) M. Dubourg fait savoir que ceux des ferments alcooliques qui n'ont pas d'action inverse apparente et, par conséquent, ne sauraient se développer dans les solutions de saccharose et y déterminer une fermentation, peuvent y être amenés: en les cultivant par la méthode que voici on pourrait causer la formation de l'invertine: L'espèce de levure en question est engendrée dans un liquide nutritif riche en matière azotée (eau de levure) et où l'on a dissous 5 p. c. de glucose et 5 p. c. de sucre de canne. Quand la fermentation paraît terminée, on décante avec précaution le liquide, et lave une ou deux fois avec de l'eau stérilisée le dépôt de la levure. La levure ainsi lavée est alors introduite dans un liquide nutritif avec de la saccharose; au bout de 24 heures, cette dernière sera intervertie, et la fermentation en pleine activité. L'auteur dit en outre avoir répété cette expérience sur la galactose et qu'à l'égard des sucres étudiés, toutes les levures qu'il a essayées se sont comportées comme il a décrit plus haut. Ces sucres présentaient pourtant une exception: la lactose, et, parmi les ferments alcooliques, le *Mucor alternans* donnèrent à l'expérience un résultat négatif. Dubourg dit en terminant: „Le fait paraît donc général pour les levures.“

L'unique manière de comprendre ce mémoire est d'y voir la prétention d'avoir découvert une méthode permettant d'amener à la facile et prompt évolution de tel ou tel enzyme les ferments alcooliques en général (et entre autres les levures: *Saccharomyces*) auxquels il manque, à l'aide d'un mode de culture déterminé. Telle a aussi été l'opinion que M. Duclaux a eue de Dubourg dans son *Traité de microbiologie*, III (1900).

En divers points, Dubourg est peu clair, et il ajoute au défaut de sa communication de ne point indiquer sur quelles espèces il a expérimenté. De plus, il laisse ignorer si les espèces qu'il a employées à ses expériences sont complètement dépourvues des enzymes que plus tard elles ont récupérés, dit-il, ou si ces enzymes y étaient déjà développés, mais en très petite quantité. En effet, pour peu que la levure en question contienne l'enzyme dont il s'agit, il n'y a rien de remarquable à ce que, pendant un certain temps, l'affaiblissement maintienne la fonction enrayée et qu'au contraire la quantité d'enzymes augmente quand la cellule reçoit un aliment fortifiant, comme dans le cas présent d'une culture en eau de levure. Mais on ne saurait en conclure que des espèces entièrement dépourvues de cet enzyme puissent devoir à une culture déterminée la faculté de développer cet enzyme. Dubourg aurait dû expérimenter sur des espèces connues, dans lesquelles on ait constaté le manque absolu de cet enzyme; ses essais y auraient gagné en clarté et on aurait pu les contrôler plus facilement. Surtout il y aurait eu toutes raisons pour étudier des espèces telles que le *Saccharomyces Marxianus*, le *Sacch. Ludwigii* ou le *Sacch. apiculatus*; d'après les recherches de nombre de savants, les deux premières espèces ne contiennent pas de maltase, et la dernière n'a ni maltase ni invertine: ces trois espèces auraient donc été d'excellents objets d'étude.

Du moment donc que Dubourg ne spécifie aucune espèce et que son mémoire entier pivote sur des expressions plus ou moins vagues (telles que „action inversaire apparente“, „il paraît que“, etc.), il n'y aurait pas eu lieu de faire des expériences de contrôle, si dans son *Traité de microbiologie*, III (1900) Duclaux n'avait adopté les résultats de Dubourg et même ne les avait érigés en loi générale, s'en servant à l'appui de l'opinion d'après laquelle les levures ne sauraient être classées d'après leur action sur les sucres. En somme, il formule le rejet des ouvrages systématiques de microbiologie, autant à propos des bactéries que des levures. Dans un compte rendu que j'ai publié précédemment au *Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.*, 2. Abth. VI, 255 (1900) concernant le travail ci-dessus, j'ai, de plus, dévoilé la série de méprises qu'il a faites. Ici nous ne nous occupons que de l'action des levures sur les sucres. Mes recherches ont de nouveau confirmé que nous sommes précisément en face de l'un des caractères les plus constants, et les recherches de Dubourg, bien loin de contredire cette assertion, n'ont fait au contraire que contribuer à l'affermir encore davantage.

Il y a déjà plusieurs années qu'au Laboratoire Carlsberg on a fait des essais pour amener des levures incapables de faire fermenter la

maltose à faire fermenter cette espèce de sucre. On a expérimenté sur le *Sacch. Marxianus*, le *Sacch. exiguus* et le *Sacch. Ludwigii*. La première de ces espèces, fut cultivée sous peu de pression de l'acide carbonique développé pendant la fermentation, dans la pensée qu'en pareilles conditions ce *Saccharomyces* serait à même d'attaquer la maltose; mais il n'en fut rien. Dans les expériences sur le *Sacch. exiguus* et le *Sacch. Ludwigii*, on pensait que peut-être les cellules des cultures en moût très anciennes seraient forcées d'attaquer la maltose faute d'autre nourriture; mais elles n'en firent rien, pas plus que leur descendance quand elle servait aux expériences. Le résultat était également négatif quand une jeune et vigoureuse végétation des deux espèces susdites était introduite dans une culture en moût à 25° C. où d'autres cellules avaient déjà enlevé les autres espèces de sucre: la maltose restante ne fut fermentée en aucun cas.

Dans ces derniers temps, on a également fait, dans notre Laboratoire, des expériences sur la culture du *Sacch. Marxianus* en eau de levure contenant 10 p. c. de maltose, et sur celle du *Sacch. apiculatus* en eau de levure contenant, soit 10 p. c. de saccharose, soit 10 p. c. de maltose; ces deux espèces furent cultivées, à 25° C., dans un tube où l'air était fortement raréfié (presque dans le vide). Au bout de dix jours, on constata que nulle part il n'y avait trace de fermentation, en sorte que, même dans les conditions ci-dessus, les deux espèces en question sont incapables de faire fermenter, le *Sacch. Marxianus* la maltose et le *Sacch. apiculatus* soit la maltose, soit la saccharose.

J'ai dirigé mes recherches sur quatre espèces qui sont toutes à la disposition des personnes désireuses de contrôler mes résultats: le *Sacch. apiculatus* et un nouveau *Saccharomyces* typique que j'ai découvert dans le tube digestif des abeilles à miel (*Apis mellifica*); de plus, les deux espèces de Hansen: *Sacch. Marxianus* et *Sacch. Ludwigii*. J'ai choisi la première de ces espèces en raison de son importance particulière, car on la trouve dans tous les laboratoires; j'y ai adjoint l'autre espèce, car c'est un *Saccharomyces* typique qui ne développe pas l'invertine; enfin l'étude du *Sacch. Marxianus* et du *Sacch. Ludwigii* était intéressante, parce qu'il s'agissait de produire l'enzyme dit maltase et de faire fermenter la maltose, sucre que Dubourg ne nomme pas expressément, il est vrai, mais qui doit être comporté par „la loi“.

Comme on devait s'y attendre, le résultat de mes recherches fut contraire à celui où était arrivé Dubourg. La connaissance de l'action des *Sacch. apiculatus*, *Sacch. Marxianus* et *Sacch. Ludwigii* sur les sucres est due, on le sait, aux recherches bien connues de M. Hansen (1881 et 1888), recherches dont la justesse a été

confirmée plus tard par d'autres investigateurs. En 1895, alors que ces espèces avaient déjà depuis longues années subi la culture dans les conditions les plus variées — tantôt en moût, tantôt en d'autres liquides nutritifs — j'ai soumis les deux premières espèces à un examen de contrôle, et montré que durant le temps considéré il n'y avait rien de changé dans leurs actions sur les deux sucres, maltose et saccharose.

A Berlin, M. Emil Fischer et ses collaborateurs ont fait des études de contrôle qui confirment également les indications de M. Hansen. En donnant aux expériences le but susdit, ils sont arrivés à des résultats négatifs. Ainsi MM. Fischer et Thierfelder ont cultivé le *Sacch. Pastorianus* I en eau de levure contenant un mélange de l-mannose et de dextrose, dans l'intention de faire fermenter la mannose; mais cette tentative échoua complètement. Les traits principaux des communications qu'on va donner, ont déjà été publiés dans une notice préliminaire faite dans le *Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.*, 2. Abth. VI, 241 (1900).

Expériences sur le *Sacch. apiculatus*, Reess.

Le but était donc de faire produire à cette espèce, d'après les indications de Dubourg, l'inversion d'une solution de saccharose.

Une jeune et vigoureuse végétation, engendrée en 3 jours à 25° C. dans une solution de dextrose et de saccharose dans l'eau de levure, futensemencée dans de l'eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de saccharose. Abandonné à lui-même à 25° C. pendant 5 jours, le liquide fut décanté, et le dépôt de la levure lavé à l'eau stérile, à 3° C., une fois dans l'espace de quelques heures. Cette levure ainsi lavée servit à infecter un matras chargé d'eau de levure additionnée de 10 p. c. de saccharose, ainsi qu'un autre où il y avait de l'eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de saccharose, la culture devant être continuée à 25° C. La culture en solution de saccharose dans l'eau de levure fut maintenue à 25° C. et essayée chaque jour à la liqueur de Fehling pour y constater la présence du sucre interverti. Même au bout de 9 jours d'abandon, il n'y avait pas encore trace de réduction: aucune inversion n'avait donc encore eu lieu. Cette espèce ayant reçu une seconde culture en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de saccharose durant 6 jours à 25° C., le liquide fut décanté et, sans laver le dépôt de la levure (afin de ne pas en enlever l'invertine qui aurait pu s'y former), on en enseigna une eau de levure à 10 p. c. de saccharose, qu'on laissa à 25° C.; mais là non plus l'espèce en question ne fut pas capable d'intervertir la saccharose.

Essais du *Saccharomyces* n. sp. isolé des abeilles à miel.

Dans les liquides nutritifs, les cellules de cette espèce se présentent comme rondes ou ovales, et fortement agglomérées, d'où résulte que le dépôt de la levure forme une masse cohérente. Sur gélatine au moût, ces cellules sont souvent très allongées et, au bout d'un temps assez prolongé, elles y développent des endospores en plus grandes quantités que dans les cultures sur blocs de plâtre, où parfois aucune formation de spores n'a lieu. Au début, les colonies macroscopiques sur gélatine au moût peuvent ressembler à la Pézize (*Peziza*). Cette espèce fait fermenter les solutions de dextrose, de fructose et de maltose, mais reste impuissante devant la saccharose, et n'agit que lentement sur le moût de bière.

J'ai traité cette espèce exactement de la même manière que le *Sacch. apiculatus*. Seulement, pour le lavage, après la deuxième culture en solution de dextrose-saccharose dans l'eau de levure, j'ai remplacé, par une solution de saccharose dans l'eau de levure, l'eau pure que j'avais employée après la première culture. Mais, pas plus que le *Sacch. apiculatus*, cette espèce ne put être amenée à intervertir les solutions de saccharose.

Essais du *Sacch. Marxianus*, E. Chr. Hansen.

Une végétation jeune et vigoureuse, engendrée à 25° C. en 3 jours dans un mélange de moût et d'une solution de dextrose dans l'eau de levure, fournit une semence en eau de levure où l'on avait dissous 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Au bout de 5 jours, à 25° C., la culture ne donnait plus signe de fermentation; le liquide fut décanté, et le dépôt de la levure lavé à l'eau stérile à 3° C. une fois en quelques heures. La levure ainsi lavée futensemencée partie en eau de levure contenant 5 p. c. de maltose, partie en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Après 9 jours d'abandon à 25° C., il ne s'était pas produit trace d'alcool dans la solution de maltose dans l'eau de levure (pas de réaction par „larmes“, méthode Pasteur, ni de réaction à l'iodoforme à la Lieben). Le dernier matras infecté, chargé d'eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose, ayant séjourné 9 jours à 25° C., le liquide fut décanté, et le dépôt de la levure lavé à l'eau stérile de la manière ci-dessus décrite. La levure lavée fut de nouveau semée dans une solution de maltose dans l'eau de levure; mais cette fois non plus il ne se forma pas d'alcool.

Le *Sacch. Marxianus* est donc incapable de faire fermenter la maltose, même après culture suivant le procédé Dubourg décrit plus haut.

Essais du *Sacch. Ludwigii*, E. Chr. Hansen.

Comme on le sait, cette espèce est aussi impuissante que le *Sacch. Marxianus* à faire fermenter la maltose. Une végétation jeune et vigoureuse, engendrée à 25°C. en 24 heures dans du moût, fut semée en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose, et la culture tenue à 25°C. Au bout de 4 jours, comme il n'y avait plus signe de fermentation, le liquide fut décanté et la levure rapidement lavée à l'eau stérile. Une portion de ce dépôt de levure lavé fut mise dans de l'eau de levure où l'on avait dissous 5 p. c. de maltose, et la culture fut tenue à 25°C. Au bout de 7 jours, il n'y avait encore aucun signe de fermentation; les analyses faites en vue de trouver de l'alcool donnèrent un résultat négatif, car il n'y eut pas réaction du liquide par les procédés Pasteur et Lieben. Une autre partie de ce dépôt de levure servit à continuer la culture en eau de levure contenant 5 p. c. de dextrose et 5 p. c. de maltose. Le dépôt de levure qui s'y produisit, fut ensuite semé, sans lavage, dans de l'eau de levure contenant 5 p. c. de maltose, et la culture laissée à la température ordinaire pendant 3 mois. Je visitai souvent cette culture pour chercher si l'on pouvait y découvrir des signes de fermentation; mais je n'en observai jamais. Au bout de ces 3 mois, le liquide ne donnait de réaction ni par les „larmes“ ni par l'iodoforme; il ne contenait donc pas d'alcool.

Dans les expériences qui précèdent, j'ai donc non seulement copié exactement le procédé Dubourg, mais l'ai même dépassé en poursuivant le traitement durant une culture de plus, et, en certains cas, j'ai opéré sans laver la levure afin de ne pas la dépouiller de l'enzyme qui aurait pu s'y former. Néanmoins, je suis toujours arrivé au résultat que voici.

Résultat:

Dubourg a tort de prétendre que les levures qui ne contiennent pas tel ou tel enzyme, peuvent être amenées à produire cet enzyme, si on les cultive d'après le procédé indiqué par lui. Par conséquent, la conclusion qu'en tire Duclaux est également fausse; il dit que l'action des ferments alcooliques sur les sucres ne peut pas servir à caractériser l'espèce. Au contraire, on a de nouveau constaté que c'est là un de nos plus constants caractères de l'espèce.

Septembre 1900.

Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques

Par

Emil Chr. Hansen.

XI.

La spore de *Saccharomyces* devenu sporange.

Dans une communication que j'ai publiée en 1899 dans le „Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf.“, 2^{te} Abth., p. 1, j'émettais l'idée qu'il serait possible d'amener la spore de *Saccharomyces* à développer des spores dans son intérieur, en d'autres termes à devenir sporange elle-même. Ce terme se prend ici dans l'acception qui a cours actuellement, c'est-à-dire comme une désignation comprenant toutes cellules à formation de spores endogènes. Bien que l'hypothèse que j'avais avancée ait failli faire crier au paradoxe, elle est néanmoins maintenant un fait avéré dont on trouvera la démonstration dans ce qui va suivre.

Pour prouver combien mon hypothèse était fondée, j'ai eu diverses difficultés à surmonter. Comme on le sait, ce ne sont pas toutes les cellules — même des espèces à sporulation particulièrement vigoureuse — qui produisent des spores quand on les cultive à cet effet. Une autre difficulté, c'est qu'on n'est pas à même de faire cet essai d'un bout à l'autre dans une chambre humide sur la table du microscope de telle façon qu'on puisse avoir l'œil sur chaque individu en particulier: tout au contraire, aux différentes phases de l'expérience, on est obligé de transporter des cellules d'un flacon dans un autre. En conséquence, une pareille expérience ne saurait être menée à bonne fin que si pendant toute l'étendue du chemin à parcourir on est continuellement à même de distinguer les spores renflées d'avec les cellules végétatives qui se trouvent parmi elles. Quant à plusieurs espèces, cela est tout-à-fait impossible. Ici comme ailleurs dans le domaine de nos recherches, il ne suffit pas que le raisonnement soit juste: pour être sûr de réussir, il faut encore un objet qui se prête aux expériences parti-

culières dont il s'agit. J'en ai trouvé un dans la levure à sporulation vigoureuse dite *Johannisberg II*.

Voici la manière dont j'ai procédé :

Je fis la culture de la manière ordinaire, dans des flacons Freudenberg chargés de minces couches d'eau et abandonnés à la température de 25°C . Lorsqu'un grand nombre de cellules eurent développé les organes de reproduction en question (voir fig. 1 *a*), elles furent transportées dans des flacons analogues, mais qui contenaient une mince couche de moût de bière, et qui ont été abandonnés en certains cas à une température de 34° , dans d'autres cas à 25°C . Au bout de 4 heures, les spores commencent en général à se gonfler, et plusieurs d'entre elles prennent la forme de boudin ou de rognon, tandis que d'autres

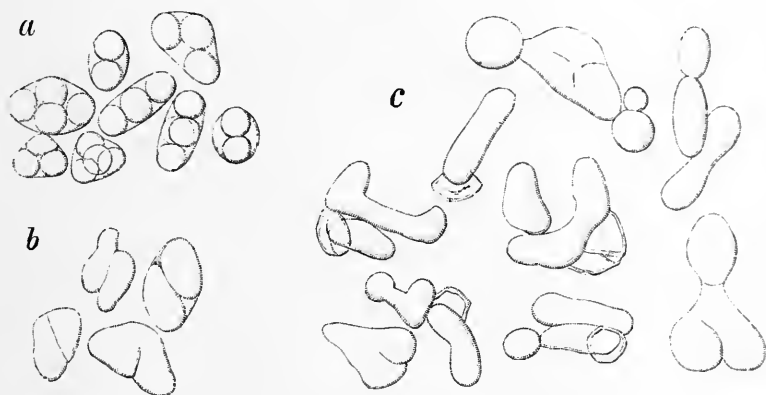


Fig. 1. *Johannisberg II*.

a, groupe de cellules à spores mûres; *b*, les mêmes cellules après 4 heures de culture dans une mince couche de moût à 34°C .; *c*, après 7 à 9 heures à 34°C . On voit surtout dans ce dernier groupe des exemples d'un fusionnement des spores; on aperçoit la paroi rompue de la cellule mère, adhérente à plusieurs des spores qu'elle renfermait. Quelques-unes de celles qui sont représentées à droite ont commencé à pousser des bourgeons. Grossissement linéaire de 1000 fois.

revêtent des formes tout-à-fait bizarres; parfois, deux ou plusieurs spores fusionnent (fig. 1 *b*). 3 à 5 heures après, on constate en général que la paroi de la cellule mère s'est rompue; les spores ont augmenté en grandeur, et les formes baroques sont encore plus prononcées qu'au-paravant, fig. 1 *c*. Arrivées à cette phase de leur développement, les spores furent enlevées au liquide nourricier et transportées dans d'autres flacons, contenant une mince couche d'une solution saturée de sulfate de chaux. D'autres expériences m'avaient fait constater, en effet, que ce liquide possède la propriété de faire cesser le bourgeonnement sans cependant arrêter la production de spores. La culture dans la solution de sulfate de chaux avait lieu à la température de 25°C . Après avoir passé de 3 à 6 jours dans ce liquide, la plupart des

spores renflées avaient elles-mêmes formé des spores dans leur intérieur. La spore était donc devenue sporange (voir fig. 2).

Les cellules végétatives qui accompagnaient les spores semées formaient, elles aussi, des endospores dans ces circonstances; mais on pouvait les distinguer des spores renflées par leur forme régulière, ronde et ovale. D'ailleurs, mon point de départ était assuré par le fait que dans beaucoup de cas, comme le montrent les figures, les spores semées étaient réunies à la membrane de la cellule mère.

La spore de *Saccharomyces* se prépare à la germination, comme c'est le cas pour les champignons en général, en absorbant des matières nutritives, qui la font gonfler. Chez l'espèce qui nous occupe ici, comme chez les *Saccharomyces* typiques en général, la spore germe en

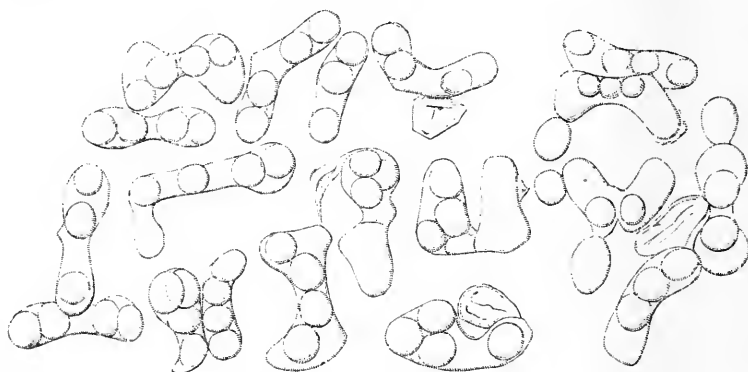


Fig. 2. Johannisberg II.

Les spores renflées représentées par la fig. 1 c ont, après 3 à 6 jours de séjour dans une solution saturée de sulfate de chaux à 25°C. formé des spores dans leur intérieur; la plupart de celles qui se trouvent représentées dans la fig. 2 sont mûres, seulement un petit nombre de cellules en renferment qui n'ont pas encore atteint leur maturité. Chez plusieurs des spores représentées au milieu et à droite, on aperçoit encore la paroi rompue de la cellule mère, et l'on y trouve également des cellules qui, avant le commencement de la sporulation, avaient poussé des bourgeons. Grossissement linéaire de 1000 fois.

poussant un ou plusieurs bourgeons. Par là, elle s'est métamorphosée en cellule de levure, et dès ce commencement de sa carrière de cellule de levure, elle peut développer des spores dans son intérieur (voir en fig. 2 quelques-unes des cellules à droite), ou bien poursuivre le bourgeonnement. Il va de soi que les spores fusionnées peuvent, elles aussi, figurer comme sporanges.

Les expériences ci-dessus mentionnées montrent d'une manière claire que le chemin de la spore à la cellule mère de spores peut être parcouru sans intervention d'aucune génération intermédiaire végétative. Elles confirment en même temps le fait, démontré ailleurs, que la formation des spores chez l'espèce en question n'est pas précédée d'une conjugaison des cellules.

Évidemment, une recherche telle que celle qui nous occupe pourra de diverses manières servir à élucider la question de savoir s'il existe ou non un acte sexuel chez les champignons, question qui a été vivement discutée en ces derniers temps. Toutefois, à l'état actuel de nos connaissances à ce sujet, des débats de cette nature ne sauraient, pour le moment, mener à des constatations de quelque importance, et voilà pourquoi je ne tâcherai pas non plus d'approfondir ici ce problème.

Il serait d'un intérêt particulier d'examiner ce qui aura lieu si l'on poursuit à travers quelques générations cette sporulation sans bourgeonnement; mais une pareille expérience présente encore plus de difficultés que celle que je viens de décrire.

On sait que la spore de *Mucor* se gonfle très fortement pendant qu'elle se prépare à la germination. Par leur faculté de figurer comme cellules de levure ainsi que par leur aspect général, ces spores renflées présentent tant de ressemblance avec la spore de *Saccharomyces* que l'on pourrait bien s'imaginer qu'elles aussi doivent être aptes à développer des spores dans leur intérieur, c'est-à-dire à se transformer en sporanges. Toutefois, les expériences que j'ai faites dans ce sens ne m'ont jamais donné qu'un résultat négatif.

Il est vrai que le phénomène que j'ai observé n'est pour le moment qu'un fait isolé; mais il ne le restera pas longtemps, je crois. On est fondé à admettre qu'il n'apparaît pas seulement chez les autres *Saccharomycètes*, mais encore ailleurs dans le vaste domaine des champignons.

Mars 1902.

XII.

Recherches comparatives sur les conditions de la croissance végétative et le développement des organes de reproduction des levures et des moisissures de la fermentation alcoolique.

1. Saccharomyces.

Aperçu de mes recherches antérieures.

Quant à la première partie de ces recherches, j'en ai fait un rapport détaillé dans le second mémoire de la présente série 1883, et j'y ai aussi rendu compte de la bibliographie de ce sujet.

La première communication relative aux conditions de la formation de spores chez les *Saccharomyces*, est due à J. de Seynes (1868). Ce savant émet l'opinion que les spores n'apparaissent que quand la culture se fait dans des conditions défectueuses d'alimentation, par exemple dans l'eau, dans des solutions fortement étendues de sucre, gomme, etc. Un peu plus tard (1869), Reess observa qu'elles peuvent aussi se développer quand les cellules végétatives sont semées sur des tranches de pommes de terre (soit crues, soit cuites) ou d'autres parties semblables de plantes, et puis cultivées dans une cloche à parois humides. Il adoptait la méthode de son prédécesseur, en ce que, dans le courant d'une quinzaine de jours, il lavait la levure, à plusieurs reprises, dans de l'eau. Quant à la température, il pensait qu'on favorise la production des spores en effectuant la culture à une température basse, soit à 8 à 10° C., ou au-dessous. Quant à la levure de bière à fermentation haute, il est d'avis que pour qu'elle puisse développer des spores il faut d'abord la transformer en levure de fermentation basse, etc.

En 1872, Engel recommanda d'employer des blocs de plâtre pour la culture de spores, ce qui constitue en quelque sorte un perfectionnement de la technique. Ses travaux ne fournirent cependant point de contribution à la compréhension des conditions et de la méthode: il n'a fait que reproduire l'erreur de ces devanciers.

Bref, en certains points, les observations que l'on faisait à cette époque-là étaient bien exactes; mais en d'autres points, elles étaient tout-à-fait erronées. En conséquence, on n'avait pas prise sur la culture en question; tantôt la sporulation avait lieu, tantôt elle manquait: on travaillait au hasard et à tâtons. Aussi des objections furent-elles soulevées contre les affirmations de ces savants, et parmi leurs collègues il y en avait qui doutaient de l'existence réelle de la sporulation.

Lorsque, en 1883, je publiai mon traité relatif à ces phénomènes, les investigateurs qui avaient répété avec des résultats positifs les essais de culture de spores des MM. de Seynes et Reess pensaient généralement que les cellules, pour pouvoir développer des spores, devaient se trouver à l'état d'inanition; le fort lavage effectué par Reess allait aussi dans le même sens. Mes recherches montrèrent, au contraire, que pour s'assurer une sporulation abondante il faut justement prendre pour point de départ des cellules vigoureuses, bien nourries. La doctrine de la transformation de la levure haute de bière en levure basse, elle aussi, se trouva être une erreur. En outre, mes recherches me firent constater que les conditions de température jouent un rôle important et que, à l'encontre de l'opinion émise par Reess, la température optima n'est pas basse, mais au contraire assez haute, à savoir, pour les espèces examinées par moi, voisine de 25°C.

En me basant sur ces expériences, j'élaborai la méthode suivante: Les cellules de levure sont cultivées pendant quelque temps dans du moût de bière marquant environ 14‰ Ball. et à la température ordinaire du laboratoire; puis je transporte, de la dernière de ces cultures, une jeune végétation dans de nouveau moût de la même composition que le précédent, après quoi la culture se fait dans le courant de 24 heures et à 25°C. environ. Les jeunes cellules bien nourries engendrées de cette manière sont alors placées, par couche mince, sur la surface d'un bloc de plâtre placé dans un bocal convenable; puis on ajoute de l'eau, mais de façon qu'elle ne puisse toucher à la surface du bloc. On couvre le bocal d'un couvercle ne fermant pas bien. Le dispositif des expériences était tel que non seulement la végétation elle-même était tenue uniformément humide, mais qu'en outre elle était pourvue d'une quantité abondante d'air humide. J'ai cru devoir donner tous les détails de mon procédé parce qu'ils sont nécessaires pour pouvoir comprendre ce qui suit et que je ne puis présumer que tous mes lecteurs aient mes publications antérieures sous la main.

Dans mes recherches sur les conditions de température, je me servis de la méthode que je viens de décrire. Le résultat fut que le développement des spores s'est trouvé dépendre de la température, de

telle sorte que dans les limites où les spores peuvent se produire, cela se fait lentement aux basses températures, plus vite aux températures plus élevées, jusqu'à un certain point, à partir duquel la sporulation redevient plus lente et finit bientôt par s'arrêter. J'ai aussi constaté que les points fondamentaux, notamment ceux déterminés par les températures maxima et minima, donnaient des caractères utiles pour différencier les espèces. J'ai déterminé les courbes de température de six espèces.

Mon mémoire cité plus haut rapporte aussi quelques recherches préliminaires faites sur l'influence de la température sur le bourgeonnement et qui ont notamment démontré ce fait que les températures maxima des différentes espèces ne sont pas identiques.

C'est dans mon traité sur la formation des voiles, publié en 1886 dans la même série, qu'on trouve la première communication relative aux rapports entre le bourgeonnement et la sporulation chez les *Saccharomycètes*. J'ai montré dans cette publication que le maximum de température pour le bourgeonnement dans le moût de bière est supérieur à celui du bourgeonnement à la surface du moût (la formation de voiles), et que d'un autre côté la température maxima de cette dernière formation est supérieure à celle de la production de spores. Mon analyse du *Saccharomyces cerevisiæ* I a montré en outre que la température minima de la formation des voiles est inférieure à celle de la sporulation, et les analyses des autres espèces indiquaient le même sens. La détermination de la formation des voiles est plus difficile que celle de la sporulation; aussi, comme je l'ai dit expressément dans le traité cité, les tableaux ne donnent-ils à cet égard que des valeurs approximatives. Il faut donc, pour pouvoir bien comprendre tout cet état de choses, recourir au texte qui accompagne les tableaux. La publication citée contient des courbes de température pour la formation de voiles dans les six espèces dont j'avais en 1883 déterminé les courbes de température de la sporulation. En ce qui concerne le bourgeonnement dans le moût, je n'avais alors fait que des analyses préliminaires destinées seulement à m'orienter. Les résultats définitifs et exacts, on les trouvera enregistrés dans la section suivante, qui donne mes recherches nouvelles.

Les publications précitées montrent en outre que de vieilles cellules, elles aussi, peuvent également former des spores, mais que cette sporulation s'opère avec plus de lenteur et n'atteint pas une si haute température limite que dans le cas où la végétation semée sur les blocs de plâtre se compose de cellules jeunes. J'ai démontré aussi que la sporulation n'a pas seulement lieu dans l'eau, mais encore dans des liquides nutritifs et sur des milieux nutritifs solides, par exemple sur

la gélatine mélangée de moût de bière. C'est surtout de mes expériences sur les liquides qu'il ressort combien l'aération est un facteur important pour la production de spores.

La question devait naturellement se poser, si la régularité, la loi, que mes recherches avaient démontrée dans les rapports entre les températures limites de la croissance végétative et le développement des spores chez les *Saccharomycètes* ne s'appliquait pas également aux Champignons en général. En dehors de mes travaux cités plus haut, on n'avait fait alors qu'une seule analyse qui pût l'indiquer, à savoir celle faite par Wiesner en 1873 du *Penicillium glaucum* (Sitzungsber. der Akademie der Wissensch, Bd. LXVIII, 1. Abt. Vienne 1874). Il n'entreprend pas de tirer des conclusions générales et ne fait que décrire son analyse. Le *Penicillium glaucum* est, on le sait, un nom sous lequel on désigne plusieurs espèces et races différentes; c'est ce qui explique qu'en examinant deux de celles-ci je suis arrivé à des chiffres divergeant beaucoup de ceux donnés par Wiesner. De même que pour les *Saccharomyces*, j'arrivai à ce résultat que la température maxima de la formation du mycélium est supérieure à celle de la formation de conidies; par contre, le minimum de la température fut la même pour les deux fonctions. Dans les expériences de Wiesner, la formation de conidies s'arrêtait à 3°C., tandis que la croissance végétative se continuait à 21/2°C.; par contre, dans mes expériences cette limite s'est trouvée être de 1/2°C. pour l'une et l'autre de ces deux fonctions.

Dans mes „Biologische Untersuchungen über Mist bewohnende Pilze“ (Botan. Ztg., Heft VII (1897)) j'ai fait la description de quelques expériences que j'avais faites sur l'*Anixiopsis stercoraria* à l'effet d'éclaircir la question qui nous occupe ici. La température maxima du développement du mycélium et de la formation des gemmes chez cette espèce s'est trouvée être sensiblement supérieure à celle du développement des périthèces, ce qui concordait bien avec la règle que j'avais constatée dans les *Saccharomyces*. Par suite de ces observations, j'émettais l'idée que ceci devait être vrai pour les Champignons en général. J'en ai fourni de nouvelles preuves dans le chapitre traitant du *Mucor*.

Dans mon mémoire précité paru en 1883, j'avais fait remarquer ce fait que dans les brasseries, distilleries et fabriques de vin on n'engendrait, à travers de longues séries d'années, que des générations de cellules végétatives, et dans un nombre excessivement élevé. Or, j'ai constaté également chez l'*Anixiopsis stercoraria* que la formation de spores manquait quand les conditions dans lesquelles ce champignon se trouvait étaient de nature à permettre une croissance végétative luxuriante et non interrompue. C'est là, en somme, un fait qu'on peut assez souvent observer dans les Champignons. D'un

autre côté, j'ai observé que la faculté de produire des spores n'est pas affaiblie pendant ce développement interminable de générations purement végétatives.

Chez l'*Anixiopsis stercoraria*, la formation des périthèces est précédée par le développement d'un système végétatif particulier. Voilà, en somme, un phénomène que nous sommes habitués à observer chez les Champignons. On pourrait maintenant se demander si quelque chose d'analogue a lieu dans les Saccharomycètes avant la formation des spores. Quand nous faisons la culture sur des blocs de plâtre ou dans des matras, nous ne saurions décider si, oui ou non, cette fonction est propre à un terme défini de l'évolution des cellules végétatives. Nous ne savons pas combien de générations ont précédé, et nous ignorons de même si, oui ou non, nous sommes ici en face d'un développement successif et nécessaire d'éléments végétatifs. Afin d'éclaircir cette importante question, il nous faut poursuivre dès le commencement jusqu'à la fin la marche de l'évolution en prenant pour point de départ une cellule unique. J'ai rendu compte des recherches que j'ai faites à ce sujet dans une communication préliminaire publiée au commencement de l'année 1899 dans le „Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Inf.“, 2^{te} Abth.

Dans l'une de ces séries d'essais j'ai expérimenté sur des cellules jeunes et vigoureuses engendrées de la manière décrite ci-dessus, dans du moût de bière; dans la seconde série les cellules provenaient de cultures en moût assez vieilles. Dans l'un et l'autre cas elles furent lavées dans l'eau distillée dans le courant de 1 à 2 heures à 20°C. Je fis la culture sur la table du microscope à 25°C. dans une chambre de Ranvier avec grand accès d'air et dans de l'eau distillée. Les cellules semées ne doivent pas donner un bourgeonnement trop abondant, parce qu'alors on ne sera pas à même de se tenir au courant de l'ordre suivant lequel se succèdent les cellules nouvellement formées; mais, d'autre part, il est nécessaire de pourvoir à des conditions favorables à la production de spores. L'expérience fut faite sur deux espèces, savoir le *Saccharomyces cerevisiae* I et le *Johannisberg* II. Les jeunes cellules se multiplièrent d'abord pendant quelque temps par bourgeonnement et formèrent des colonies; puis, elles se sont mises à produire des spores, et de telle sorte que les premières spores se formèrent dans la cellule mère de la colonie et que de celle-ci la sporulation progressa vers les membres plus jeunes de la colonie; au bout de quelques jours, je pouvais généralement constater l'apparition de spores même dans les cellules les plus jeunes. La fig. 1 ci-contre, que j'ai dessinée après avoir publié la communication précitée, montre cet état de choses. Cette expérience nous a

donc appris que la régularité se manifeste même ici et que les cellules étaient capables de former des spores directement sans bourgeonnement préalable.

Ceci s'est manifesté d'une façon encore plus évidente dans mon expérience relative aux cellules vieilles. En effet, pourvu que nous ayons choisi la vraie phase d'évolution, il se produit ici une sporulation dans un nombre plus ou moins grand et sans bourgeonnement précédent. Les deux espèces avaient atteint ce point après un laps de temps très différent: dans le *Saccharomyces cerevisiæ* I ordinairement après que la culture en moût de l'espèce en question eut séjourné 10 jours à la température ordinaire du local; chez le *Johannisberg* II, au contraire, pas même après 3 semaines, bien que d'ordinaire au

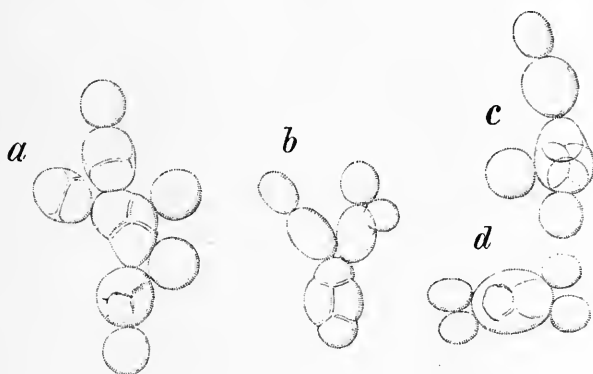


Fig. 1. *Sacch. cerevisiæ* I.

Des cellules lavées se trouvant dans de l'eau dans des chambres Ranvier au large accès d'air, au bout de 5 jours de repos à 25°C. *a.* une colonie dont la cellule mère se trouve au milieu; la cellule mère a poussé cinq bourgeons, puis formé des spores dans son intérieur; trois des cellules secondaires contiennent également des spores, l'inférieure n'étant pas encore arrivée à l'état de maturité. En *b*, *c* et *d*, ce ne sont que les cellules mères qui sont arrivées à la formation de spores; les spores de *c* et *d* ne sont pas encore mûres.

Grossissement linéaire de 1000 fois.

bout d'environ 7 semaines, dans certains cas même seulement au bout de plus de 2 mois $\frac{1}{2}$. Les cellules des voiles des deux espèces, elles aussi, formaient directement des spores dans les conditions indiquées.

J'ai montré dans la même communication que les jeunes cellules bien nourries peuvent, elles aussi, être amenées à passer sur le bourgeonnement et à former des spores immédiatement, à savoir quand elles sont placées dans des conditions favorables à la production de spores, mais défavorables au bourgeonnement. J'ai fait cet essai sur le *Johannisberg* II, dont je plaçai des cellules dans une solution aqueuse saturée de sulfate de chaux, au lieu de les placer dans de l'eau. Elles aussi, les recherches rapportées dans mon mémoire précédent et qui

firent constater que la spore peut se présenter comme sporange, démontrent le même fait.

On est venu peu à peu à se servir généralement de la méthode de culture de spores que je viens de décrire (voir p. 69); mais quant à l'importance des conditions du développement des spores, on n'était pas toujours d'accord.

Dans son traité intitulé „Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze“. III. (Jahrb. f. wissensch. Botanik, XXXV (1900)) Klebs fait mention de mes recherches et affirme d'une manière emphatique que le manque de nourriture est un facteur absolument nécessaire. En même temps il me fait le reproche de n'avoir point fait attention à l'existence de ce facteur. Ni l'un ni l'autre n'est exact. En effet, dans la méthode que je recommandais particulièrement et que j'employais dans la plupart de mes expériences, la culture se faisait, on se le rappelle, justement dans de minces couches d'eau, où par conséquent l'absence de nourriture constituait un facteur bien évident.

Cependant il va de soi que ladite absence de nourriture ne peut point constituer en elle-même une condition directe. La nourriture peut manquer, en effet, tant aux cellules elles-mêmes qu'à leur entourage sans qu'il se produise de sporulation et, inversement, — mes recherches ci-dessus mentionnées en fournissent la preuve —, des cellules bien nourries, et également des cellules qui se trouvent dans un bon milieu nourricier, sont néanmoins capables de développer ces organes de reproduction. Le manque de nourriture est assurément un facteur important quand il s'agit de faire arrêter le bourgeonnement et d'introduire par là la formation de spores: mais il n'est point le seul facteur produisant cet effet, et lorsqu'enfin les cellules se trouvent au début de la carrière de la sporulation, il faut tout un ensemble d'autres facteurs pour qu'elles puissent atteindre le but. Je mettrai tout cela en évidence dans la section traitant les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation. Il y a d'autres points encore sur lesquels mes recherches ont mené à un résultat différent de celui auquel est arrivé Klebs. On le trouve spécialement au dernier chapitre, dans lequel je traite du genre de *Mucor*.

Recherches nouvelles.

Le bourgeonnement.

Cette fonction a lieu avec plus de vigueur dans les liquides nutritifs que sur les milieux nutritifs solides. Le meilleur liquide nourricier que nous connaissions sous ce rapport, c'est le moût de bière

mentionné si souvent dans mes publications; la gélatine au moût constitue un bon milieu nourricier solide. Quant aux exigences que font les cellules au milieu nourricier pour qu'un bourgeonnement puisse se produire, elles sont, règle générale, très modestes. C'est ainsi que dans ce qui précède nous avons vu qu'elles peuvent développer des colonies entières dans de l'eau distillée. Relativement aux conditions spéciales chimiques du bourgeonnement et de la sporulation, M. le Dr Artari a commencé dans le temps des recherches au laboratoire de Carlsberg; on peut espérer le voir bientôt publier un mémoire traitant de ce sujet; je ne m'y arrêterai donc pas. D'ailleurs, les questions principales du présent mémoire se rapportent à autres choses. Pour faire les analyses que je vais décrire, MM. Klöcker et Schiönning m'ont prêté leur concours.

L'air atmosphérique joue un rôle important dans le bourgeonnement; aussi est-il généralement connu — ayant été constaté maintes fois, non seulement dans les expériences de laboratoire, mais encore dans les opérations pratiques des industries de la fermentation — que l'aération accélère la multiplication de la cellule de levure, et des expériences directes ont fait constater que cet effet est dû à l'action de l'oxygène. Quant à l'azote de l'air, il doit plutôt être considéré comme indifférent, et sa faible teneur en acide carbonique ne joue pas non plus un rôle appréciable. Le bourgeonnement peut se produire même dans les cas où il n'est pas possible de constater la présence d'oxygène libre. C'est ce que montrent les expériences sur l'azote dépourvu d'oxygène qui seront décrites dans la section suivante. Ces expériences ont été faites sur des espèces de *Saccharomyces* qui vivent plongées dans le liquide; mais les principaux résultats qu'elles ont apportés sont probablement applicables également à des espèces telles que les *Saccharomyces anomalus* et *Sacch. membranæfaciens*, qui dès le commencement de leur croissance se multiplient en formant des voiles.

Pour les expériences sur l'influence de la température, j'employai une végétation jeune et vigoureuse engendrée de la manière que j'ai décrite plus haut en parlant de la culture de spores. Je mis une semence assez abondante dans des flacons Freudenberg remplis à peu près à moitié de moût de bière. Cette culture fournit les conditions les plus favorables au bourgeonnement et a, par conséquent, servi de base à mes expériences. Des essais de contrôle furent pratiqués dans des chambres Ranvier fermées et chargées du même liquide. Pour certaines espèces le développement eut lieu ici avec un peu plus de difficulté que dans les flacons. Toutefois, les résultats principaux furent au fond les mêmes.

Comme nos recherches n'ont pas uniquement pour but de déter-

miner les températures limites du bourgeonnement, mais encore de faire une comparaison entre celles-ci et les températures limites de la sporulation, il faut aussi faire la culture dans les mêmes conditions que pour cette dernière fonction. C'est pourquoi une série des essais de bourgeonnement fut faite dans de minces couches d'eau et dans les flacons et chambres mentionnés ci-dessus. Aux températures élevées, les cultures étaient abandonnées à une atmosphère humide afin d'empêcher l'évaporation. Voici les températures limites trouvées par la culture en moût:

Sacch. cerevisiæ I:	maximum de la tempér.	40°;	minimum de temp.	3—1° C.
S. Pastorianus I:	—	34°;	—	1/2° -
S. Pastorianus II:	—	40°;	—	1/2° -
S. Pastorianus III:	—	39—40°;	—	1/2° -
S. ellipsoïdeus I:	—	40—41°;	—	1/2° -
S. ellipsoïdeus II:	—	40°;	—	1/2° -
S. Marxianus:	—	46—47°;	—	1/2° -
S. anomalus:	—	37—38°;	—	1—1/2° -
S. membranæfaciens:	—	35—36°;	—	1/2° -
S. Ludwigii:	—	37—38°;	—	3—1° -
Johannisberg II:	—	37—38°;	—	1/2° -

Les températures maxima des onze espèces examinées varient de 47° à 34° C., les minima de 3 à 1/2° C., étant pour la plupart des espèces voisins de 1/2° C.

Les résultats qu'ont apportés ces expériences nous montrent d'une manière bien nette que les diverses espèces ont des températures limites différentes, et ils nous fournissent de nouveaux contingents à leur caractérisation. Il saute aux yeux que le Sacch. Pastorianus I occupe une place à part vis-à-vis des deux autres espèces du même groupe. La plus haute température maxima se trouve chez le Sacch. Marxianus; cette espèce dépasse sous ce rapport de beaucoup toutes les autres. Les deux espèces dont la température maxima est la plus élevée sont l'une et l'autre des levures de fermentation basse. Il appert donc de nouveau — j'ai fait cette constatation déjà auparavant — qu'on a tort de vouloir établir la règle que les levures de fermentation haute se développeraient à des températures plus élevées que celles de fermentation basse.

Parmi les espèces ci-dessus mentionnées, les Sacch. anomalus et Sacch. membranæfaciens sont du nombre de celles qui dans des conditions normales forment rapidement des voiles à la surface des liquides dans lesquels elles sont cultivées; toutefois cela ne se produit pas dans le voisinage des températures limites, où, par contre, elles ne se multiplient que comme levure de dépôt.

En plusieurs endroits de mes publications, j'ai eu l'occasion de

donner des exemples du pouvoir morphogénique qu'a la température dans les levures et les bactéries acétifiantes. Les expériences que je viens de communiquer fournissent une nouvelle contribution à l'élucidation de ce sujet. Elles ont montré que dans la culture des *Saccharomyces* typiques en moût près de la température maxima il apparaît des caractères morphologiques grâce auxquels on peut classer les diverses espèces dans deux séries différentes, dont l'une comprend les *Sacch. cerevisiæ* I, *Sacch. Pastorianus* II et III, *Sacch. ellipsoïdeus* I et II, et enfin *Sacch. Marxianus*, tandis que la seconde renferme les *Sacch. Pastorianus* I et *Johannisberg* II. Les espèces de la première de ces deux séries développent des végétations composées de cellules rondes et ovales; ainsi les *Sacch. Pastorianus* II et III ont donc aux hautes températures entièrement changé de forme, et les autres espèces de cette série ont subi un rehaussement tout particulier de la forme typique propre aux *Sacch. cerevisiæ* et *Sacch. ellipsoïdeus*. Dans les circonstances analogues les deux espèces de la seconde série: les *Sacch. Pastorianus* I et *Johannisberg* II, développent par contre des cellules en forme de boudin et allongées. Ainsi, le *Sacch. Pastorianus* I se comporte aussi sous ce rapport tout-à-fait différemment des *Sacch. Pastorianus* II et III, et quant au *Johannisberg* II c'est une transformation de la forme typique représentée dans la semence qui a eu lieu. Cette espèce est une véritable levure de vin, et se rapproche d'ailleurs des *Sacch. ellipsoïdeus* I et II, avec lesquels elle concorde également pour la forme des cellules quand la culture se fait à la température ordinaire ou autour de l'optimum. Dans le cours de la culture aux hautes températures, ses cellules ont pris une forme tout-à-fait différente de celles des deux autres espèces. Comme ces recherches ne se rattachent pas pleinement aux buts principaux de ce traité, je n'y insisterai plus. Une communication plus détaillée relative à la valeur de ces nouveaux caractères, accompagnée d'illustrations, sera publiée dans un mémoire ultérieur. Plus nous approfondissons la biologie de ces organismes, plus nous découvrons de caractères permettant de distinguer nettement les espèces entre elles.

Une comparaison du tableau ci-dessus avec mon aperçu des températures limites de la sporulation (p. 83) fait voir que la température maxima du bourgeonnement est supérieure, dans toutes les espèces, et que la température minima est inférieure, aux températures respectivement maxima et minima de la sporulation. La culture en eau distillée a donné le même résultat principal. Toutefois, dans ces derniers cas les espèces ont des températures maxima inférieures et des températures minima supérieures à celles qu'on constate dans les cultures en

moût. Du reste, les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation seront examinés dans les deux sections qui suivent.

La formation de spores.

Les conditions d'alimentation qui sont généralement favorables aux bourgeonnement des cellules le sont également quand il s'agit de les amener à un état qui leur fournisse les meilleures conditions d'une vigoureuse production de spores. Quant à la manière dont cette culture est réalisée, j'en ai déjà parlé dans la première section; nous allons envisager maintenant l'influence de l'air et de la température.

Suivant Klebs, l'air et son oxygène n'exercent guère d'influence essentielle sur la formation des spores. Toutefois, il conserve une certaine réserve en ce qu'il fait ressortir qu'on n'a pas encore fait de recherches spéciales dans ce sens. Cependant, mes publications antérieures contiennent quelques essais préliminaires sur ce sujet, qui lui ont échappé et auxquels je vais suppléer dans la suite. Ces expériences nouvelles furent faites dans des liquides et dans des flacons Freudenberg. Ce procédé est mieux approprié aux questions dont il s'agit que les cultures sur blocs de plâtre. Rien qu'à faire une culture comparée de spores dans de minces et dans d'épaisses couches de liquide, on ne tardera pas à apercevoir la grande importance de l'aération. On peut se servir à cet effet tant de liquides nutritifs que d'eau distillée. Je décrirai maintenant les plus importantes de mes expériences de l'un et de l'autre genre.

De jeunes cellules du *Sacch. Pastorianus* I et du *Johannisberg* II furent semées dans du moût de bière renfermé dans des flacons Freudenberg à la température de 25°C. Dans l'une des deux séries d'expériences les flacons furent remplis (15^{cc} de liquide, à la hauteur de 45^{mm}), tandis que dans l'autre on ne mit que 7 gouttes dans chacun d'eux. Afin d'empêcher l'évaporation, le tube surmontant le capuchon était mis en communication avec un tube courbé. Les deux séries ne différaient l'une de l'autre qu'en ce que dans la première on expérimentait avec des couches épaisses de liquide, tandis que dans la seconde elles étaient très minces. Après quelques jours, les deux espèces avaient développé des spores dans les couches minces de liquide, tandis que dans les couches épaisses les spores faisaient défaut même après plus d'un mois. De petites quantités de liquide prises dans les flacons chargés d'épaisses couches et renfermant les cellules qu'on y avait semées furent transportées dans des flacons vides, qui furent ensuite, eux aussi, laissés en repos à une température de 25°C. Or, au bout de moins de 14 jours, je pus constater un développement de spores dans tous ces flacons. Dans tous les cas, l'accès plus libre de

l'air avait pour effet la formation de spores, tandis que dans les cas où l'aération manquait, elle n'avait pas lieu. Je pouvais constater, en outre, que les cellules vieilles ont de plus grandes exigences relativement à l'aération que les jeunes. D'autres essais, qui furent faits de la même manière, mais au moyen des chambres humides, donnèrent un résultat principal analogue. Naturellement, on eut égard à l'influence qu'une accumulation d'acide carbonique pouvait avoir.

Des expériences réalisées de la même façon que celles que je viens de décrire, mais dans lesquelles j'avais substitué de l'eau distillée au moût, firent également voir que la formation des spores dépend à un haut degré de l'aération.

J'ai également pu observer dans ces expériences que les individus ne se comportent pas identiquement: quelques-uns peuvent se contenter de la très minime quantité d'air qu'au début de l'expérience ils trouvent dans l'épaisse couche d'eau; d'autres ne s'en contentent point. Pour que la grande majorité de cellules puissent suivre dans cette voie, il faut une forte provision d'air; dans les couches épaisses cela n'a lieu qu'imparfaitement, et seulement après un temps plus ou moins long. Si dans une culture en eau on place des cellules vieilles et usées, il peut se produire le cas que seulement les cellules où l'air a largement accès dès le début de l'expérience produisent des spores, et qu'aucune des cellules renfermées dans les épaisses couches d'eau n'y arrive. Un pareil résultat eut lieu dans une expérience sur des cellules des *Sacch. Pastorianus* II et *Sacch. ellipsoïdeus* I provenant d'une végétation engendrée dans l'espace de 20 jours dans de l'eau distillée à 25° C. Si cette végétation avait passé encore plus longtemps dans les circonstances indiquées, le moment serait naturellement venu où le manque de nourriture aurait produit l'effet de rendre impossible toute sporulation, quand même les cellules seraient placées dans les conditions les plus favorables sous ce rapport. De ce point jusqu'à la limite de la vitalité il peut y avoir un grand chemin à parcourir. En somme, c'est dans les expériences sur les cellules âgées que la nécessité de l'air saute le plus aux yeux.

A ce groupe d'expériences se rattache aussi celle que je vais décrire et qui se rapporte aux *Sacch. cerevisiæ* I et *Sacch. Pastorianus* I. Après avoir lavé, pendant 1 heure $\frac{1}{2}$ à 2° C., des végétations jeunes prises dans des cultures en moût, je les ai semées dans des flacons Freudenberg contenant de minces couches d'eau (dans chaque flacon 5 gouttes) et desquels l'air avait été chassé. Je plaçai une série de ces flacons sous une cloche avec une solution alcaline de pyrogallole, une autre série en dehors de la cloche, dans l'un et l'autre cas à la température de 25° C. On a raréfié, par aspiration, l'air renfermé dans

la cloche jusqu'à ce que la pression fût de 15 à 16^{mm} de mercure. Au bout de 6 jours, tous les flacons qu'on avait laissés en dehors de la cloche se trouvaient avoir produit des spores en abondance, tandis que dans les végétations renfermées dans la cloche on n'en a pu constater aucune trace. Puis, ces dernières végétations furent également placées en dehors de la cloche, de sorte que l'air y eut accès; la conséquence fut qu'au bout de quelques jours elles donnèrent toutes une assez abondante production de spores. Par conséquent, également pour ce dispositif des expériences, c'était la provision d'air qui provoquait la sporulation.

Comme nous l'avons rappelé plus haut, on a en général supposé que l'oxygène était le plus important des éléments de l'air à l'égard de la production de spores; mais on n'a pas fait d'expériences spéciales pour le prouver. Dans ce qui va suivre, on examinera sous ce rapport et séparément chacun des principaux éléments de l'air atmosphérique: azote, oxygène, acide carbonique.

Pour ces recherches j'ai choisi les deux espèces *Sacch. cerevisiæ* I et *Johannisberg* II, types de levure qui ne sont pas seulement de vigoureux producteurs de spores, mais qui présentent en outre des exemples vraiment typiques de levure haute et levure basse, de levure de bière et de levure sauvage. Le résultat acquiert par là une plus grande universalité. Quelques-unes de ces expériences furent faites avec des cellules vieilles, d'autres avec des cellules jeunes, mais toujours prises dans une végétation de culture en moût. Les vieilles végétations provenaient d'une culture à la température ordinaire du laboratoire, soit pendant 7 jours, soit durant 2 mois, les végétations jeunes d'une culture en 24 heures à 25°C. Pour quelques-unes des expériences, on les a prises directement dans la culture en moût dans laquelle elles avaient été engendrées, tandis que pour les autres expériences on les a préalablement lavées rapidement dans de l'eau stérilisée et à environ 1°C. Ce traitement n'a cependant exercé aucune influence sur le résultat principal. La plupart de ces expériences furent faites dans les cultures en eau décrites ci-dessus, partie en couches minces, partie en couches épaisses. Dans tous les cas, l'eau avait été débarrassée immédiatement auparavant de son air, puis rapidement saturée du gaz dont il s'agissait. Après que les cellules de levure y eurent été ajoutées, on a expulsé vivement et complètement l'air qui se trouvait dans le flacon au-dessus du liquide, en même temps qu'on y a introduit le gaz sur lequel l'expérience devait être faite. Les expériences ont été réalisées en partie de façon qu'on ferma complètement les flacons immédiatement après les avoir remplis du gaz en question, en partie de sorte qu'on fit passer sans cesse ce gaz à travers le flacon, soit au

travers du liquide même, soit seulement sur sa surface. Les flacons étaient munis, suivant les cas différents, de tubes etc. appropriés à ces diverses exigences. A côté de ces flacons, on plaça des flacons de contrôle et contenant des cultures traitées de la manière décrite, mais auxquels l'air atmosphérique avait accès. La température était de 25 °C.

Au bout de 5 jours, les cultures à l'azote ne montraient encore aucun signe de sporulation, tandis que les cultures de contrôle contenaient au contraire, comme à l'ordinaire, beaucoup de spores. Lorsque les cultures à l'azote furent exposées à l'action de l'air atmosphérique, elles formaient, elles aussi, de nombreuses spores après 5 jours.

Les expériences faites avec l'acide carbonique donnèrent le même résultat principal. Quoique ce gaz soit un principe virulent pour les cellules, elles peuvent pourtant en supporter une quantité assez considérable sans cesser complètement le bourgeonnement et la production de spores.

Enfin, on a aussi, et de la manière ci-dessus décrite, entrepris une série d'expériences avec l'oxygène; pour comparer, on avait en ce cas placé des cultures tout-à-fait analogues, mais avec exclusion de l'oxygène. On en vint à constater que la sporulation avait lieu constamment dans les cultures additionnées d'oxygène, et jamais dans celles desquelles l'oxygène était complètement éliminé.

Quant à l'élimination de l'oxygène, elle n'a pas seulement été pratiquée de la manière ordinaire, soit à l'aide d'une solution alcaline de pyrogallole, mais encore au moyen d'une solution chlorhydrique de l'acétate de protoxyde de chrome. C'est mon collègue, M. le Dr Sørensen, qui a eu l'amabilité de m'indiquer ce dernier procédé excellent.

Comme on devait s'y attendre, les expériences dont on vient de parler ont démontré que l'oxygène est un facteur absolument nécessaire pour la production de spores.

Le bourgeonnement peut aussi avoir lieu quand même l'oxygène viendrait à manquer; il en a été ainsi dans les expériences ci-dessus décrites et faites dans l'azote libre d'oxygène. En cela, cette fonction se distingue donc nettement de la sporulation. Il suffit cependant d'une petite quantité d'oxygène pour que des cellules vigoureuses puissent former des spores. On sera par conséquent déçu si l'on ne prend pas soin que les gaz sur lesquels on expérimente soient complètement débarrassés d'air atmosphérique et d'oxygène. Les communications publiées en ces derniers temps et d'après lesquelles la sporulation devait dans certains microorganismes pouvoir se produire vigoureusement dans l'azote pur, tiennent sans doute à une erreur de ce genre.

Dans son mémoire „Ueber die Fettbildung bei den niederen Pilzen“

(Sitzungsber. d. K. Bayr. Acad. d. Wissensch., 1879), Nägeli émet l'idée que la sporulation ne s'opère que „quand les cellules se trouvent répandues, dans un état à demi desséché, sur un substratum“. Toutefois, il ne paraît pas que cette assertion soit basée sur des recherches spéciales. Elle a passé dans les „Vorlesungen über Pflanzenphysiologie“ de Sachs, et de cet ouvrage dans plusieurs autres écrits; on l'a également avancée parfois dans les derniers temps. Nous allons examiner de plus près cet état de choses.

Si dans les expériences ci-dessus avec la bière dans les chambres Ranvier nous ne prenons pas soin d'exclure toute évaporation, il ne s'opère aucune sporulation. Les cellules de la culture en eau sont, il est vrai, un peu moins susceptibles à cet égard, mais le résultat principal reste cependant le même. Je vais décrire ici une expérience que j'ai faite dans le temps et ayant en vue cette question: Je préparai de la manière ordinaire une série de cultures sur blocs de plâtre, et aussitôt que ceux-ci eurent absorbé de l'eau au point de s'en remplir complètement, je les tirai des coupes renfermant l'eau et les transportai chacun dans sa coupe vide. Celle-ci ne vint à contenir d'autre liquide que celui qu'apportaient les blocs eux-mêmes. Quelques-unes de ces coupes furent fermées avec leurs couvercles en verre, les autres au contraire avec du papier-filtre. Pour pouvoir comparer, je mis de côté quelques cultures ordinaires sur blocs de plâtre; ces blocs étaient constamment entourés d'eau, et l'air était saturé d'humidité. La température à laquelle cette expérience fut réalisée était de 25°C. Le résultat fut que la formation des spores s'opérait plus vite et plus abondamment dans les cultures ordinaires, à savoir après 24 heures de repos; venaient ensuite les cultures sur les blocs fermés avec un couvercle en verre dans les coupes vides, à savoir après 29 heures de repos; en troisième ligne venaient les cultures couvertes seulement de papier-filtre: sur ces blocs la production des spores n'avait lieu qu'au bout de 44 heures, et encore sur quelques-uns d'eux seulement. Toutefois, même ici la levure s'était maintenue humide. Toutes ces expériences montrent, en un mot, que l'évaporation empêche la formation des spores, bien que plusieurs des cellules puissent aussi développer ces corps de reproduction quand elles se trouvent sur un milieu exposé à quelque évaporation.

Dans la nature c'est surtout dans les couches supérieures du sol que se développent les spores, à condition bien entendu que ces couches aient un degré convenable d'humidité; les spores se forment également dans le jus provenant de fruits, tels que les raisins, prunes, groseilles à maquereau, cerises, etc. Quant aux conditions favorables à la sporulation et que nous offrons aux cellules dans nos expériences de labora-

toire, les rencontreront-elles bien rarement dans la nature, où bientôt après leur entrée dans la voie de la sporulation elles seront très souvent exposées à ce qu'une évaporation survienne autour d'elles. Les expériences ci-dessus décrites nous montrent que quelques-unes d'entre elles, même dans ces conditions peu favorables, sont à même de parcourir d'un bout à l'autre la marche complète du développement. En conséquence, la sporulation a lieu plus fréquemment dans la nature qu'on ne devrait s'y attendre.

L'agent qui se prête le mieux à l'analyse, c'est la température; aussi ai-je insisté tout particulièrement sur les analyses faites sous ce rapport. Au chapitre 1^{er}, j'ai renvoyé brièvement aux courbes de température pour la marche évolutionnaire des spores que j'avais déterminées en 1883 dans six espèces. Plus tard, j'ai déterminé les températures limites de ladite fonction dans le *Johannisberg II*. Nielsen et Klöcker ont effectué des analyses analogues des *Sacch. anomalus*, *Sacch. membranæfaciens*, *Sacch. Ludwigii* et *Sacch. Marxianus* (Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg III, 1894, Livr. 3, et IV, 1895, Livr. 1). Les températures limites pour la sporulation de ces espèces sont indiquées ci-après pour la comparaison des températures limites du bourgeonnement (voir p. 76).

<i>Sacch. cerevisiæ</i> I	A	36—37°	peu de cellules sporif., à	37½° C. point.
-		11—12°	—	9° - —
<i>S. Pastorianus</i> I	-	29½—30½°	—	31½° - —
-		3—4°	—	½° - —
<i>S. Pastorianus</i> II	-	27—28°	—	29° - —
-		3—4°	—	½° - —
<i>S. Pastorianus</i> III	-	27—28°	—	29° - —
-		8½°	—	4° - —
<i>S. ellipsoïdeus</i> I	-	30½—31½°	—	32½° - —
-		7½°	—	4° - —
<i>S. ellipsoïdeus</i> II	-	33—34°	—	35° - —
-		8°	—	4° - —
<i>S. Marxianus</i>	-	32°	—	34° - —
-		8°	—	4° - —
<i>S. anomalus</i>	-	32—32½°	—	34° - —
-		6—7½°	—	2½—3° - —
<i>S. membranæfaciens</i> . . .	-	33—33½°	—	35° - —
-		6—7½°	—	2½—3° - —
<i>S. Ludwigii</i>	-	32—32½°	—	34° - —
-		6—7½°	—	2½—3° - —
<i>Johannisberg II</i>	-	33—34°	—	34½° - —
-		3°	—	2° - —

Dans ces derniers temps, d'autres auteurs encore ont aussi publié des recherches sur la marche d'évolution des spores dans d'autres espèces que les susmentionnées; mais comme les déterminations des températures limites correspondantes du bourgeonnement manquent, aucune comparaison ne peut avoir lieu; je ne m'y arrêterai donc pas.

Les températures limites de la sporulation chez les espèces ci-dessus nommées se trouvent entre 37 et 3⁰ C. et sont d'un côté inférieures, de l'autre côté supérieures à celles du bourgeonnement, ce qui concorde avec ce que j'ai fait remarquer précédemment. On pourrait supposer que l'espèce qui a la plus haute température maxima pour le bourgeonnement aurait également la plus élevée pour la sporulation, et qu'une telle relation devrait se trouver également pour les températures minima des deux fonctions; mais il n'en est rien; tout au contraire, il se produit ici une assez grande variété de combinaisons, et voilà ce qui en partie fait que les températures limites nous fournissent tant de caractères utiles pour différencier les espèces. Une comparaison des deux tableaux le fait ressortir nettement.

Les déterminations données ci-dessus furent faites, on se le rappelle, sur des végétations engendrées dans du moût de bière. Dans ma communication provisoire précitée dans le „Centralbl. f. Bakt. etc.“, 2^{te} Abth., 1899, j'ai rapporté quelques expériences faites sur des végétations engendrées dans les deux liquides nutritifs suivants, l'un et l'autre d'une composition chimique définie:

Peptone	1 ‰
Dextrose	5 ‰
Phosphate primaire de potassium.....	0,3 ‰
Sulfate de magnium	0,2 ‰
et	
Peptone	1 ‰
Maltose	5 ‰
Phosphate primaire de potassium.....	0,3 ‰
Sulfate de magnium	0,5 ‰

Ces essais furent faits sur les trois espèces *Sacch. cerevisiæ* I, *Sacch. Pastorianus* I et *Johannisberg* II, du reste de la manière décrite ci-dessus.

Le *Sacch. cerevisiæ* I a formé peu de spores à 35⁰ C., à 37⁰ C. point de spores.

Le *Sacch. Pastorianus* I a formé peu de spores à 29⁰ C., à 31⁰ C. point de spores.

Le *Johannisberg* II a formé peu de spores à 33—34⁰ C., à 35⁰ C. point de spores.

Quoique ces végétations fussent engendrées dans des liquides nutritifs dont la composition chimique était très différente de celle du moût, les températures maxima qu'on a trouvées concordent néanmoins assez bien avec celles données plus haut; en tant que des différences se faisaient remarquer, elles consistent en ce que lesdites températures sont un peu plus élevées pour les végétations engendrées dans le moût que pour celles qui provenaient des deux solutions artificielles.

Sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation.

Dans cette section nous allons passer en revue les résultats exposés dans ce qui précède, et les discuter. J'y ajouterai quelques recherches nouvelles, et j'insisterai, en les examinant de plus près, sur certains points qui précédemment n'ont été mentionnés que brièvement. Je commencerai par les phénomènes morphologiques pour passer ensuite aux conditions par lesquelles, dans nos essais de culture de spores, le bourgeonnement peut être amené à s'arrêter: finalement, nous considérerons les conditions directes de la formation de spores.

Si nous plaçons une cellule de levure dans des conditions favorables d'alimentation, le bourgeonnement ne tardera pas à se produire, et une colonie sera fondée. Tant que les cellules dont se compose celle-ci restent unies les unes aux autres, nous pouvons considérer le tout comme un système végétatif. Ce dernier peut subir un développement ultérieur, et dans certaines conditions il peut, du moins chez certaines espèces, se présenter comme un mycélium. Dans tous ces cas il n'est question que d'une croissance végétative. Les cellules peuvent rester unies en colonies pendant un temps plus ou moins long; mais elles peuvent aussi se détacher et fonder des colonies nouvelles. Dans ce dernier cas elles figurent donc comme organes de reproduction. Selon leur forme et selon la nature de la paroi, on les a quelquefois dénommées „conidies de levure“, „oïdies de levure“ et „chlamydospores de levure“. Cependant, nous l'avons vu, les mêmes cellules peuvent aussi développer des spores dans leur intérieur, et cela non seulement quand elles sont libres, mais aussi lorsqu'elles constituent des membres d'une colonie. On considère généralement une pareille cellule mère de spores comme un asque.

Les cellules de levure passent très facilement d'une valeur morphologique à l'autre; et il en est de même de la spore, du moins pour ce qui concerne les *Saccharomyces* typiques. Dans ce qui va suivre, il ne sera question que de ces derniers.

Les spores de ces espèces germent par le bourgeonnement et se transforment par là en cellules de levure; comme telles, elles peuvent passer par les valeurs ci-dessus mentionnées et ensuite se développer

en sporanges. Et la spore renflée, qui par la germination n'est pas encore entrée dans la phase de cellule de levure, peut aussi, comme nous l'avons appris dans le traité précédent, devenir sporange, donc sans qu'il se forme une seule génération végétative.

Malgré la facilité avec laquelle les cellules passent d'une forme à une autre, néanmoins ces fonctions, bourgeonnement et sporulation, sont deux choses à part et peuvent se séparer complètement. J'ai démontré dans mon mémoire sur la variation (la présente série 1900) que nous pouvons enlever à la cellule la dernière de ces fonctions sans pour cela empiéter sur la première. De plus, il est fort probable que nous arriverons aussi un jour à éliminer le bourgeonnement, de sorte que la sporulation resterait seule. Les recherches exposées dans mon mémoire précédent nous ouvrent la perspective d'y parvenir.

Nos recherches nous ayant montré non seulement que chaque cellule végétative est apte à développer des spores directement, mais encore que la spore elle-même peut devenir sporange, il est établi par là qu'il n'est pas nécessaire que la formation de spores soit précédée d'un système végétatif. Conséquemment, les *Saccharomycètes* se distinguent sous ce rapport non seulement des plantes supérieures, mais probablement encore de la plupart des Champignons.

Toutefois, la marche ordinaire de l'évolution consiste en ce que, avant le commencement de la sporulation, il se forme par bourgeonnement de nombreuses générations de cellules végétatives. Tant que les conditions extérieures le permettent, les cellules continuent à se multiplier par le bourgeonnement. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1^{er}, elles peuvent persister dans cette voie pendant de longues années et former d'interminables générations végétatives.

Il est bon de remarquer que parmi les levures de l'industrie ce sont précisément les plus anciennes, à savoir les levures de bière à fermentation haute, qui se signalent par la plus active production de spores. On eût pu s'attendre ici à ce que le bourgeonnement poursuivi pendant si longtemps eût fini par supplanter la sporulation, et c'est aussi là ce que dans son temps plusieurs investigateurs considéraient comme chose admise. C'est pourquoi pour mes analyses dans ce domaine je choisis particulièrement la levure anglaise de fermentation haute que j'ai appelée *Saccharomyces cerevisiæ* I. Cette dernière a probablement vécu durant des siècles dans les brasseries d'Angleterre, où elle ne s'est multipliée que par bourgeonnement; elle n'en est pas moins encore aujourd'hui au nombre de celles qui possèdent le plus grand pouvoir de produire des spores. Plusieurs autres levures de l'industrie et levures sauvages, qui ont été cultivées pendant plus de vingt années au laboratoire de Carlsberg dans des conditions telles qu'elles ne pou-

vaient se multiplier que par bourgeonnement, ont également pleinement conservé leur faculté de produire des spores. Le résultat principal, c'est que l'emploi et le développement exclusifs de l'une de ces fonctions n'ont pas supprimé l'autre. Et pourtant il s'agit ici d'un nombre de générations dépassant de beaucoup les plus grands chiffres avec lesquels nous avons jamais à compter dans les végétaux supérieurs.

Quand, par une raison ou une autre, le bourgeonnement est arrêté, les cellules cherchent à continuer la vie par d'autres voies; elles peuvent le faire soit en formant des spores dans leur intérieur, soit en adaptant leur plasma et leurs parois de manière à pouvoir résister aux mauvaises influences extérieures que les conditions nouvelles apportaient avec elles. Parfois on ne peut découvrir aucune différence entre ces cellules et les cellules végétatives ordinaires, parfois on peut observer que leur paroi s'est épaissie et est venue à former plusieurs couches; dans ce dernier cas nous obtenons le type que chez les Champignons on appelle généralement chlamydospores. Elles peuvent revêtir toutes ces différentes formes par exemple pendant l'hivernage dans le sol qui est la règle générale pour les levures sauvages.

De là, nous passons à la considération du dispositif des différentes méthodes de culture de spores. La culture la plus fréquemment employée se fait dans de minces couches d'eau se trouvant soit à la surface des blocs de plâtre, soit au fond des matras ou dans les chambres humides, soit encore sur des couches de gélatine pure. Les cellules jeunes et bien nourries placées dans ces couches d'eau se mettent aussitôt à bourgeonner. Les matières nourricières renfermées dans leur intérieur sont par là consommées jusqu'à un certain degré, et il se développe à la fin des cellules d'une composition chimique telle que dans les conditions présentes elles ne sont plus capables de produire des bourgeons; elles commencent alors à développer des spores dans leur intérieur. On peut dire au sujet de cet état de choses que les matières nutritives propres au bourgeonnement ne sont plus présentes, tandis que celles appropriées à la sporulation s'y trouvent. Toutefois, nous ne devons pas nous figurer la chose comme une simple soustraction; il ne faut point la concevoir comme si la phase du bourgeonnement représentait quelque chose de plus et celle de la sporulation quelque chose de moins de la même matière nutritive. Il faut plutôt admettre qu'il s'opère des groupements nouveaux. Cependant la chimie ne nous est d'aucun secours sur ce terrain, et nous, nous ne sommes pas à même de commencer une analyse.

Dans la culture de spores dans les liquides nutritifs mentionnés ci-dessus: moût de bière, bière, moût de raisins, vin, eau de levure, les cellules sont situées autrement qu'elles ne le sont dans les cultures en

eau; c'est pourquoi nous pouvons admettre que, arrivées au point où le bourgeonnement s'arrête et où la sporulation commence, elles se comportent autrement qu'elles ne le faisaient lorsqu'elles en étaient au point correspondant dans les cultures en eau. Cependant, même dans ces cas, la cellule arrive à un moment où, faute de nourriture dans son entourage ainsi que dans elle-même, le bourgeonnement ne peut plus avoir lieu. Une influence des matières dues à l'action chimique de la cellule sur le milieu s'y trouve peut-être aussi sous ces conditions.

Nous avons vu au chapitre premier que des cellules qui ont atteint un certain âge et qui se trouvent dans un certain état d'alimentation, peuvent, sans bourgeonnement préalable, entrer dans la voie de la sporulation, quand on les place dans les chambres humides renfermant de l'eau distillée. De même que dans les cas précédents, on peut affirmer dans ce cas également que c'est le manque d'aliments dans la cellule même et dans son entourage qui empêche le bourgeonnement de se produire.

Dans ce qui précède, mes expériences faites sur la gélatine nutritive n'ont été mentionnées que brièvement, et puisque Klebs donne une explication qui ne concorde pas avec le résultat auquel je suis arrivé, j'ai par conséquent un double motif pour en faire une mention un peu plus détaillée ici. J'ai fait mes expériences nouvelles sur les deux espèces *Sacch. cerevisiæ* I et *Johannisberg* II semées sur des couches épaisses, soit de gélatine mélangée de moût de bière, soit de gélatine à l'eau de levure. La semence fut en plusieurs cas inoculée sur la gélatine sous forme de raies que j'y traçai, dans d'autres cas à l'état de gouttes renfermant un petit nombre de cellules de l'espèce dont il s'agissait; les cultures étaient placées sous des cloches, et l'on pourvoyait à ce que l'air fût suffisamment renouvelé et maintenu humide. Il se posa alors la question de savoir si la sporulation aurait lieu aussi sur les bords des végétations, où les cellules étaient en contact immédiat avec le milieu nourricier, ou si elle serait bornée à la partie centrale des végétations, c'est-à-dire aux cellules qui ne communiquaient plus directement avec la source d'alimentation. En examinant les végétations de *Sacch. cerevisiæ* I sur la gélatine au moût après 3 semaines de séjour à 25°C., je trouvai, sur le bord extérieur, quelques rares cellules ayant formé des spores, et après 2 mois de repos le nombre des cellules sporifères du bord paraissait égalé celui des cellules centrales. Dans de vieilles végétations de *Johannisberg* II sur la gélatine au moût, je fis des constatations analogues. Que la gélatine avoisinant le bord continuât à être un bon milieu nourricier, c'est ce qu'on pouvait montrer en y traçant, à l'aide d'un fil de platine, des raies du bord de la végétation; car ces raies prirent une croissance rapide. A l'instar de

la colonie mère, elles engendraient des cellules sporifères tant à leurs bords qu'à leur milieu. En somme, la végétation sur la gélatine continue à s'étendre, pourvu que l'on ait soin de pourvoir à ce que la température soit convenable, et à ce que l'air, suffisamment renouvelé, soit saturé d'humidité. De même que dans les cultures en eau, on pouvait observer ici encore que quelques-unes des cellules se propageaient par bourgeonnement, alors que d'autres, situées tout près des premières, développaient des endospores.

Sur la gélatine mélangée d'eau de levure, je fis également des observations analogues dans ses végétations de Johannisberg II, après que les cultures eurent séjourné dans plusieurs cas pendant 3 semaines à la température du local, dans d'autres durant 27 jours à 25°C. Inutile de rappeler que ces essais sont, de même que d'autres du même genre, soumis à des oscillations notables; il ne s'agit pour nous que du résultat principal.

Klöcker a récemment ici au laboratoire de Carlsberg fait des observations analogues dans ses essais de culture avec le *Saccharomyces* découvert par lui chez les abeilles (On trouve une description de cette levure dans les Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg, vol. V, 1900, page 62). En examinant ses végétations sur de la gélatine au moût après 26 jours de repos à la température du laboratoire, il constata, en effet, que la zone marginale contenait, en plusieurs endroits, même de très nombreuses cellules sporifères.

Même pour la sporulation qui se produit sur la gélatine nutritive. Klebs donne comme explication l'absence d'aliments. Il part, en effet, de l'opinion qu'elle n'a lieu que chez les cellules qui se trouvent dans les couches supérieures de la colonie de levure et qui ne sont pas en contact avec la substance nourricière. Selon Klebs, la formation des spores ne se produirait donc qu'au milieu des colonies, et non pas dans leur zone marginale. Or, il résulte clairement des recherches que je viens d'exposer que cette manière de voir n'est pas juste: Elles nous ont fait voir que même des cellules bien nourries et qui ont un large accès à la nourriture sont néanmoins aptes à développer des spores. Si les cellules des colonies de la gélatine nutritive s'écartent de la voie du bourgeonnement, il faut en chercher la cause dans une action exercée par des produits des cellules. L'un de ces produits, savoir l'alcool, sera mentionné plus loin.

Aux essais de culture de spores sur la gélatine nutritive viennent se rattacher ceux que j'ai entrepris dans des solutions de sulfate de chaux. On se rappellera que les jeunes cellules vigoureuses et bien nourries qu'on y avait semées développaient directement des endospores sans bourgeonnement préalable. Ces cellules sporo-

gènes sont aussi bien nourries que possible, et elles continuent à l'être; ainsi, ici non plus, il n'est nullement question d'un manque d'aliment dans les cellules elles-mêmes. Le fait est que c'est le principe virulent qu'on a mis dans l'eau qui a empêché le bourgeonnement. Quand la spore se développe directement en sporange, c'est également une cellule bien nourrie qui, sous l'action du sulfate de chaux, est mise à même de passer sur le bourgeonnement et d'entrer directement dans la voie de la sporulation. Dans tous ces cas c'est le sulfate de chaux qui empêche la cellule d'arriver par voie de bourgeonnement au point où le manque de nourriture commence.

L'alcool éthylique produit un effet analogue. Dans les solutions faibles de cette substance le bourgeonnement a encore lieu d'une manière assez active. Par contre, une solution à 10⁰/o agit en somme de la même manière que la solution saturée de sulfate de chaux. Ces expériences furent faites sur de jeunes cellules de *Johannisberg II*. Après 3 jours de séjour à 25⁰C. dans la solution d'alcool susnommée, bon nombre d'elles avaient développé des spores sans bourgeonnement préalable.

L'absence de nourriture est un élément des plus importants quand il s'agit d'arrêter le bourgeonnement, et par là elle peut dans certaines conditions de culture concourir également à la production des spores. Il va sans dire que ce n'est pas tout genre d'absence d'aliments dans la cellule, et que ce n'est pas tout genre d'absence de matières nutritives dans son entourage qui soit capable de produire cet effet; mais même là où nous avons devant nous l'absence propre de nourriture, il y a toute une gradation et un grand champ libre. En un mot, le manque d'aliments n'est qu'un des différents facteurs qui agissent dans ce sens, et à côté il y en a d'autres de même valeur. Un autre résultat important que nos recherches ont apporté à ce sujet, c'est qu'on a en son pouvoir de disposer les expériences de telle façon que des cellules qui sont abondamment pourvues de nourriture, tant dans leur intérieur qu'autour d'elles, soient néanmoins aptes à développer des spores d'une manière vigoureuse. Ceci a échappé à l'attention de Klebs, qui a attribué à l'une des parties de notre problème une importance qui ne lui revient pas.

Il va de soi que la cessation du bourgeonnement n'entraîne pas toujours la production de spores. Cette production exige, au contraire, tout un ensemble d'autres conditions; nous pouvons qualifier celles-ci de conditions directes. Les voici: un certain état favorable d'alimentation, pour lequel nous manquons toutefois une expression chimique définie, provision d'eau, affluence abondante d'air atmosphérique ou d'oxygène humides, et une température généralement assez élevée. Ces

conditions sont communes à tous les *Saccharomyces*, mais subissent pourtant des variations selon les espèces. Ceci apparaît surtout d'une manière frappante dans les tableaux relatifs à l'influence de la température sur le bourgeonnement et la formation de spores (pages 76 et 83). Mes analyses nouvelles ont, comme on le voit, apporté une confirmation complète de la doctrine avancée par moi auparavant et suivant laquelle la formation des spores a un maximum de température inférieur à celui du bourgeonnement, et elles ont en outre montré que le minimum de température de la sporulation est supérieur à celui du bourgeonnement. Maintenant que les analyses ont été effectuées sur un si grand nombre d'espèces très différentes entre elles, ce résultat peut être considéré comme définitivement établi et comme s'appliquant à tous les *Saccharomycètes*.

Une différence bien prononcée apparaît de même dans les rapports des deux fonctions avec l'oxygène, en ce que le bourgeonnement a lieu même en l'absence d'oxygène libre, tandis que ce n'est pas le cas pour la sporulation. Pour cette dernière fonction, la présence d'oxygène libre est une condition absolument nécessaire.

Nous avons vu que les cellules vieilles et celles qui souffrent de manque de nourriture, par exemple par suite d'un fort lavage, exigent à cet égard particulièrement beaucoup d'oxygène. Les cellules qui se trouvaient dans des liquides qui ne leur fournissaient pas la nourriture dont elles avaient besoin pour pouvoir continuer à bourgeonner, ne développaient des spores que lorsqu'on leur fit affluer de l'air ou de l'oxygène en abondance; autrement, il n'y avait point d'apparence de sporulation. C'est l'oxygène, et non pas le manque de nourriture, qui provoquait le développement des spores. La grande importance qu'a l'oxygène pour la formation des spores est manifeste surtout dans les expériences pratiquées dans les liquides.

Nous voilà ainsi arrivés à la fin de ces recherches sur les rapports entre le bourgeonnement et la sporulation et sur les conditions auxquelles sont soumises ces deux fonctions de reproduction. Quant aux processus qui ont lieu dans le plasma lui-même lorsque la cellule quitte la voie du bourgeonnement pour entrer dans celle de la production de spores, nous n'en savons encore rien. L'analyse des unités du plasma est un des grands problèmes qui appartiennent à l'avenir. Il est fort probable que la cellule de *Saccharomyces* est l'un des objets se prêtant le mieux aux recherches à faire dans ce sens; mais, en ce qui concerne cette question, tout est encore dans l'obscurité.

Nous sommes arrivés à connaître des procédés qui nous permettent d'arrêter le bourgeonnement de telle façon qu'une sporulation puisse suivre, et nous sommes peu à peu parvenus à voir tellement clair dans

tout ce qui concerne les conditions dans lesquelles ces deux fonctions se réalisent que nous sommes à même de détacher à notre gré et avec sûreté l'une de l'autre et de provoquer celle que nous désirons. La cellule de *Saccharomyces* se prête éminemment à l'élucidation des questions telles que celles que nous avons traitées dans cette section et qui ont de l'importance pour la biologie générale; aussi, même avec les méthodes dont nous disposons actuellement, ce terrain d'investigations reste-t-il un des plus féconds.

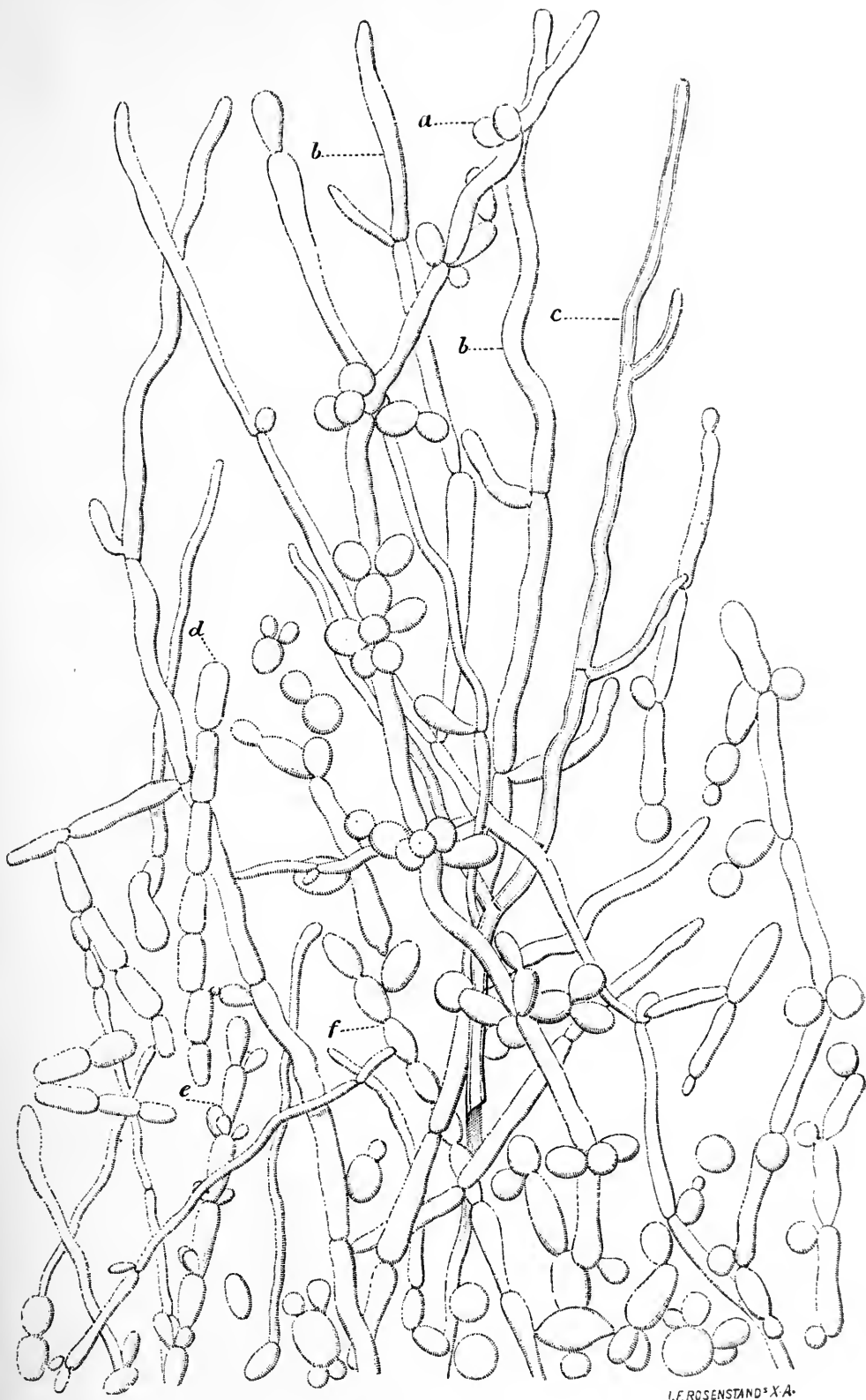
2. Levures alcooliques aux cellules ressemblant aux *Saccharomyces*.

Sous cette désignation on peut comprendre une grande série d'espèces très diverses. Plusieurs d'entre elles ont fait l'objet de recherches exposées dans mes mémoires précédents; j'en référerai particulièrement à celui intitulé „Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre“ et inséré dans l'année 1888 de la présente série.

La *Monilia candida* occupe ici une place à part; c'est une espèce qui dans les dernières années a grandement préoccupé aussi bien des physiologistes que des chimistes. On en trouve, dans le mémoire que je viens de citer, une description accompagnée d'illustrations, dont l'une est reproduite à la page suivante.

Cette figure montre qu'il se trouve chez cette espèce un mycélium type (c). En fait d'organes de reproduction, elle ne développe pas seulement des conidies de cellule de levure (a, b, e), mais encore des oïdies (d). Quand on sème les cellules de levure dans du moût de bière à la température ordinaire du local ou à 25° C., elles se multiplient pendant les premiers temps exclusivement par bourgeonnement, et ce n'est que plus tard qu'il se forme un mycélium. Si l'alimentation continue à être abondante, ce mycélium peut développer des conidies de cellules de levure ou bien se diviser en articles, à l'exemple de ce qui a lieu chez le genre dit *Oïdium*. Toutefois, sous ce dernier rapport, il n'est question que d'une similitude extérieure. Les oïdies de la *Monilia candida* germent par voie de bourgeonnement, ceux des espèces types du genre *Oïdium*, par exemple de l'*Oïdium lactis*, par contre par un tube germinatif (Voir mon mémoire sur l'*Oïdium lactis* dans ces Comptes-rendus 1879). Les remarques que je viens de faire relativement aux différences de nature morphologique, s'appliquent également à plusieurs autres cas, où ce ne sont que des analogies extérieures qui font qu'on parle d'oïdies; tel est aussi le cas en bactériologie. La morphologie comparative a ici un problème à résoudre.

La *Monilia candida* est du nombre des levures qui recouvrent rapidement d'un voile la surface du liquide nutritif. Je fis la culture



I.F. ROSENSTAND * X.A.

Fig. 2. *Monilia candida*.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

dans des flacons Freudenreich à moitié remplis de moût de bière; le tube du capuchon n'avait pas de coton, mais était muni d'un d'autre tube courbé. Dans ces circonstances les températures limites pour la *Monilia candida* se sont trouvées être de $42-43^{\circ}\text{C}$. et de $6-4^{\circ}\text{C}$. Cette espèce est donc du nombre de celles qui se distinguent par une température maxima très élevée. Toutefois, elle n'est pas capable de développer un voile près des températures limites, mais se borne alors à continuer sa croissance au-dessous de la surface du liquide nutritif. Il en est de même, nous l'avons vu, du genre de *Saccharomyces* et probablement des levures alcooliques en général. La formation de mycélium est assez prononcée aux températures basses, tandis que dans le voisinage de la température maxima c'est le développement de cellules de levure qui prend le dessus. Les cellules devenues libres ne font pas seulement fonction de conidies, mais servent également à la croissance végétative, et, inversement, toute cellule de la végétation est en état de servir à la propagation; d'organes de reproduction proprement dits, il ne s'en trouve point. Cette nature double est, en somme, propre à la formation de cellules de levure, quels que soient les champignons chez lesquels elle se produise.

Tant chez cette espèce que dans celles dont je vais traiter plus loin, le développement se fait avec une extrême lenteur aux températures basses; conséquemment, l'analyse de chaque culture a dû embrasser plus de 3—4 mois.

Les espèces de *Torula* appartiennent également au groupe dont nous nous occupons ici. Les deux suivantes ont également été décrites et illustrées dans mon mémoire précité. La température maxima de celle figurée ci-après (Fig. 3) est de $36-37^{\circ}\text{C}$., sa température minima de $6-4^{\circ}\text{C}$.

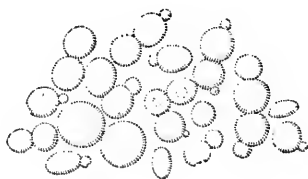


Fig. 3. *Torula*.

Levure de dépôt prise après 24 heures de culture en moût de bière à 25°C . environ.
Grossissement linéaire de 1000 fois.

Dans l'espèce représentée dans la fig. 4, ces limites sont de $38-39^{\circ}\text{C}$. et d'environ $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Le dispositif des expériences était le même que ci-dessus mentionné.

De même que dans les *Saccharomycètes*, nous rencontrons donc également dans ce groupe de champignons des espèces ayant des températures limites nettement différentes pour le bourgeonnement.

Aussi aux températures limites, la formation seule de cellules de levure a apparu dans les *Torula* examinées. Ces dernières n'ont pas changé pendant la longue série d'années au courant de laquelle je les

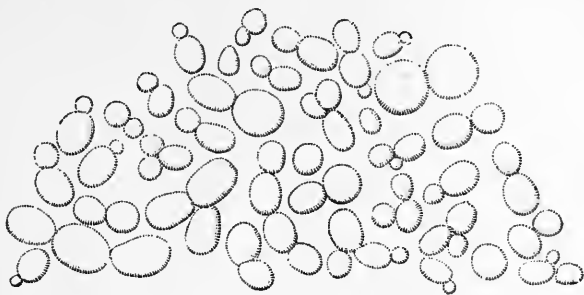


Fig. 4. *Torula*.

Levure de dépôt prise après 24 heures de culture en moût de bière à environ 25°C .

Grossissement linéaire de 1000 fois.

ai examinées. On admet généralement que les *Torula* ne constituent que de simples phases évolutives de champignons supérieurs; s'il en est ainsi, il faut des conditions spéciales de culture, inconnues jusqu'à ce jour, pour les ramener à leur origine.

3. *Oïdium lactis*.

Mes recherches antérieures sur cette espèce se trouvent exposées surtout dans les deux mémoires cités au chapitre précédent. Les expériences furent pratiquées suivant la même méthode que pour la *Monilia candida* et les *Torula*. Ce que j'ai dit relativement aux rapports entre le système végétatif et les organes de reproduction de la *Monilia candida*, s'applique également à cette espèce: elle ne présente pas de différence morphologique entre les hyphes produisant des conidies et celles formant un mycélium. Dans cette espèce les deux catégories se montrèrent aussi aux températures limites. De même que dans les espèces précédentes, la formation de voile s'arrête un peu avant que le développement ait atteint sa limite. Dans les susdites cultures en moût, la température maxima est près de $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$., la température minima au-dessous de $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Par contre, la formation de voile s'arrête à $36\frac{1}{2}$ — $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. et à 3°C . environ.

4. *Mucor*.

Les espèces appartenant à ce genre se distinguent par la diversité et la richesse de leurs organes de reproduction: on peut diviser ceux-ci en quatre catégories, à savoir gemmes (chlamydo-spores), cellules de levure, sporanges et zygosporangies.

Mes expériences furent faites sur le *Mucor racemosus*, espèce bien connue depuis longtemps, ainsi qu'avec deux espèces nouvelles formant des zygospores et dont j'ai appelé l'une *M. alpinus* et l'autre *M. neglectus*. Ces trois espèces sont des représentants de tous les caractères morphologiques qui se présentent dans ce genre. Le *M. alpinus*, de même que le *M. racemosus*, forment des cellules de levure, mais il ne produit pas d'invertine. Le *M. neglectus* ne forme pas de cellules de levure et appartient, de même que le *M. racemosus*, au petit groupe du genre *Mucor* qui développe de l'invertine; en outre, le *M. neglectus* est le type de tout un groupe inconnu jusqu'ici qui pendant la croissance produit des matières dégageant des odeurs puantes. Les contributions apportées à la physiologie et à la biologie des Mucorinées par les recherches que je vais développer, contiennent également divers renseignements sur les caractères des espèces susnommées, dont je donnerai d'ailleurs une description détaillée dans un travail ultérieur. Dans mon mémoire, cité au chapitre précédent, sur l'action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre, on trouve aussi des recherches sur le *M. racemosus*, avec des renvois à la bibliographie des Mucorinées; à cet égard, je me réfère d'ailleurs à l'ouvrage de Zopf intitulé „Handbuch der Pilze“ et au traité précité de Klebs: „Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze“ III.

Quant à la désignation „formation de gemmes“, d'accord avec la plupart des savants contemporains, je l'ai prise dans son sens le plus étendu, qui la fait comprendre les divers organes appelés aussi oïdies, gemmes proprement dites, gemmes mycéliennes et chlamydospores. Au point de vue de la morphologie, nous ne saurions les distinguer nettement entre eux.

Les gemmes du *M. neglectus* ne produisent pas de bourgeons, puisque, comme je l'ai déjà dit, cette espèce ne possède aucunement ce mode de propagation; mais, par contre, il se trouve dans les gemmes des deux autres espèces. Dans tous les cas, les gemmes ne se développent qu'un temps plus ou moins long après que la formation du mycélium a fait son apparition. Elles apparaissent dans toutes les matières nutritives où la croissance peut avoir lieu, et non seulement à l'intérieur de la substance, mais également dans les mycéliums aériens; il n'est pas même rare de les rencontrer dans les branches sporifères. On les a trouvées sur du pain, dans de la gélatine pure, dans de la gélatine additionnée d'eau de levure, de dextrine ou de différents liquides nutritifs saccharifères (par exemple moût de bière et de vin), sur un milieu fortement saccharifère tel que la gélatine additionnée de 40 pour cent de saccharose, et aussi dans des gélatines nutritives additionnées d'agar-agar, ainsi que dans lesdits liquides nutri-

tifs eux-mêmes. Elles apparaissent comme des membres plus ou moins marqués du système de végétation, et, se détachant, peuvent devenir les centres de formations nouvelles; chez les espèces bourgeonnantes, elles développent aussi bien des tubes germinatifs que des cellules de levure, tandis que dans les autres espèces elles forment seulement des tubes germinatifs. Quant à l'influence de la température sur les quatre organes de reproduction, on en parlera dans un paragraphe unique; voir le tableau donné à la page 104.

Les cellules de levure apparaissent tantôt sous forme d'un développement direct de la spore de sporange, tantôt par un bourgeonnement des gemmes et des cellules normales de mycélium. Les spores chez les espèces bourgeonnantes ont, à l'instar des gemmes, la faculté de développer tant des tubes germinatifs que des cellules de levure, et une seule et même spore peut même développer simultanément les uns et les autres. Ces cellules de levure ont reçu des noms spéciaux: on les appelle tantôt d'après leur forme: „levure sphérique“, tantôt d'après le nom générique des champignons qui les produisent: „levure de *Mucor*“; dans le présent travail on se sert de l'appellation commune „cellule de levure“.

Nous sommes ici en présence d'un phénomène qui depuis longtemps a attiré l'attention des savants, qui ont émis des opinions différentes sur les conditions auxquelles il doit son apparition. On a notamment mis en avant deux manières principales de voir la chose. Suivant l'une, ladite formation tiendrait à ce que le développement a lieu dans un milieu nutritif fermentescible privé d'air; d'après l'autre, ce serait l'acide carbonique qui agirait sur les cellules. A proprement parler, on n'a pas fait d'expériences véritables pour élucider la question. Dans le mémoire cité plus haut: „Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre“, j'ai communiqué l'observation que j'avais faite sur certaines espèces qu'elles étaient susceptibles de développer des cellules de levure et des gemmes dans des milieux nutritifs non saccharifères, par conséquent sous des conditions où aucune fermentation alcoolique n'a lieu. Cette observation semble avoir passé inaperçue. Dans ce qui suit, je décrirai des expériences nouvelles et entreprises, en vue d'éclaircir les questions dont il s'agit, sur les deux espèces *Mucor racemosus* et *M. alpinus*.

Je mentionnerai d'abord mes expériences sur le *M. racemosus*. Pour faire celles-ci, je me suis servi des ballons Pasteur à deux cols. Dans la première série, je remplis quelques-uns de ceux-ci d'eau de levure ordinaire, d'autres du même liquide additionné de 10 pour cent de dextrose; la semence était des spores provenant d'une végétation jeune et vigoureuse, et la température de l'expérience était de 25° C.

Après 8 jours de repos, je ne constatai dans l'eau de levure que le développement d'un mycélium normal sans corpuscules reproducteurs. Au bout de 3 mois, beaucoup d'hyphes contenaient une abondante formation de gemmes; les autres corpuscules reproducteurs n'apparurent point. Dans les ballons qui, outre l'eau de levure, contenaient en même temps du dextrose, il se développa non seulement une vigoureuse formation mycélienne, mais encore des gemmes et quelques cellules de levure. Dans ce cas ce fut conséquemment le sucre qui déterminait la formation des cellules de levure.

Dans la seconde série de ces essais, le liquide était saturé d'azote libre d'oxygène, et les ballons étaient également remplis du même gaz. Au reste, quant au dispositif des expériences, voir la description que j'en ai donnée en parlant du genre *Saccharomyces*. Après 5 jours de repos à 25° C., je ne pouvais encore découvrir aucun signe de germination dans la solution pure d'eau de levure, tandis que dans cette solution additionnée de 10 p. c. de dextrose il se forma au contraire rapidement une quantité abondante de cellules de levure, et rien de plus. En introduisant de l'air atmosphérique ou de l'oxygène dans les ballons contenant la solution pure d'eau de levure, j'y trouvai également après 2 jours un fort développement; mais les spores ne germaient que par un tube germinatif et développaient seulement du mycélium. Cet essai montre que, pour pouvoir germer dans de l'eau de levure, les spores exigent de l'oxygène libre, et, de plus, que l'oxygène contenu dans le plasma des spores semées n'y suffisait que quand le liquide contenait du sucre. Alors les spores formaient des cellules de levure, et, de même que dans nos expériences sur les *Saccharomyces*, ces dernières se propageaient dans des circonstances où l'oxygène libre ne pouvait être démontré. Cette partie de la seconde série d'expériences se distingue de la partie correspondante de la première en ce que l'air atmosphérique était exclu; c'est donc là qu'il faut chercher la raison pour laquelle il ne se développe pas autre chose que des cellules de levure.

J'ai fait une expérience analogue dans du moût de bière contenant de l'azote libre d'oxygène. Dans ce cas les spores formèrent également des cellules de levure, et uniquement celles-ci.

Si dans ces cultures, qui présentent un si luxuriant développement de cellules de levure, nous faisons affluer de l'oxygène ou de l'air atmosphérique, le développement prend une autre direction: le bourgeonnement s'arrête, les cellules de levure développent des tubes germinatifs, et une formation de mycélium commence. Si dès le début de nos expériences nous faisons affluer une abondante quantité d'air dans les liquides saccharifères qui renferment les végétations étudiées,

le développement de mycélium s'accroît également au point de prendre le dessus. Il ressort de ces expériences que dans les circonstances indiquées la formation de cellules de levure dépend de l'absence de l'oxygène, et qu'elle n'est point due à l'action directe de l'acide carbonique.

Si l'acide carbonique était la condition déterminante, les spores introduites dans l'eau de levure saturée de ce gaz et isolée avec lui devaient également former des cellules de levure; mais tel n'est point le cas: la germination ne se produit aucunement. D'autre part, aussitôt que nous faisons affluer un peu d'air, la germination commence; mais les spores émettent des tubes germinatifs et forment du mycélium, mais point de cellules de levure; c'est que l'autre facteur: le sucre, fait défaut. Toutes ces expériences nous apprennent que ce n'est pas l'acide carbonique qui détermine la formation des cellules de levure. La valeur que l'acide carbonique contenu dans les liquides qui fermentent peut avoir pour le développement des cellules de levure chez le *Mucor racemosus*, se borne à ce qu'il forme un barrage à l'oxygène. C'est pourquoi, quand il s'agit d'obtenir une végétation de cellules de levure sans cellules mycéliennes, on y parvient simplement en pratiquant la culture dans des matras suffisamment remplis de moût de bière à travers lequel on conduit de l'acide carbonique.

De là nous passons à la seconde espèce formant des cellules de levure: le *Mucor alpinus*. Chez celle-ci, la formation de cellules de levure n'est pas déterminée par la présence du sucre dans le liquide nutritif en question; car elle se produit également dans une solution artificielle telle que celle-ci:

Peptone.....	1 ‰
Phosphate primaire de potassium.....	0,3 ‰
Sulfate de magnium.....	0,5 ‰
Eau.....	98,2 ‰

et dans de l'eau de levure, c'est-à-dire, dans des liquides où nous ne sommes pas en état de démontrer la présence de sucre. Ceci nous fournit un caractère nouveau permettant d'établir des groupes d'espèces dans le genre *Mucor*. Une addition de maltose, de dextrose ou de saccharose aux liquides susnommés, favorise la formation des cellules de levure, mais n'est nullement nécessaire à cela.

Soit que nous fassions la culture dans l'un ou dans l'autre des milieux nutritifs mentionnés ci-dessus, on peut dire en vérité que les cellules de levure se développent en l'absence de l'air; pour la formation mycélienne, c'est le contraire qui est vrai. La condition générale de la formation des cellules de levure, ce n'est pas la présence du

sucré, mais l'absence de l'air, de l'oxygène libre, survenant dans les cultures. Le sucre ne constitue qu'une condition spéciale pour le *M. racemosus* et les espèces apparentées à celle-ci. Dans les liquides mentionnés non sucrés, cette espèce développe, par contre, non seulement des gemmes, mais encore des sporanges. Chez le *M. alpinus* les zygospores comme tous les autres organes de reproduction apparaissent dans ces circonstances.

Si nous avons soin que l'air n'ait pas accès à nos cultures, nous pouvons continuer la formation des cellules de levure, pour ainsi dire, à l'infini. C'est ainsi que j'ai cultivé le *M. racemosus* durant plus de 9 mois dans des matras contenant du moût de bière fréquemment renouvelé. Aussitôt que j'ai fait affluer abondamment l'air atmosphérique, la formation mycélienne a complètement pris le dessus. En ceci, les cellules de levure du *Mucor* se distinguent d'une manière frappante de celles du *Saccharomyces*. Chez le *Mucor* la formation de cellules de levure se trouve encore à son début; chez plusieurs espèces elle est totalement absente, et là où elle existe, elle n'a pas pris un développement comme chez les *Saccharomyces*. C'est dans les conditions normales d'existence qu'il est plus facile aux espèces de *Mucor* de produire le mycélium que les cellules de levure, tandis que pour les *Saccharomyces* c'est l'inverse qui a lieu. Chacun de ces genres a une direction principale qui lui est propre.

Les gemmes et les cellules de levure du *Mucor* ne forment, pendant des périodes plus ou moins longues, que des échelons de l'évolution végétative et ne se distinguent que très peu des cellules mycéliennes proprement dites. Ce que j'ai dit au chapitre premier de la nature protéique de la cellule de levure du genre *Saccharomyces* et de ses caractères morphologiques en général, s'applique d'une manière générale aussi à la cellule de levure du *Mucor*; seulement, il faut remarquer que tous les essais que j'ai faits pour amener celle-ci à développer des spores dans son intérieur, ont constamment échoué.

D'autre part, le sporange et la zygospore sont des corpuscules reproducteurs ayant une évolution à part et un caractère morphologique bien accusé; en même temps, l'un et l'autre, en opposition avec les cellules de levure, sont des types aériens bien prononcés. Les gemmes, comme nous l'avons vu, tiennent le milieu entre les deux; elles sont de nature amphibienne et paraissent aussi bien dans l'air que dans des liquides.

Pour que les sporanges et les zygospores puissent se former, il faut que le développement ait lieu sur un milieu solide, ou, s'il a lieu dans un liquide, la végétation doit pouvoir s'élever jusqu'à la surface et former ici une couche solide d'où les branches mycéliennes qui

doivent développer lesdits organes puissent s'élever dans l'air. Quand la végétation se trouve dans d'épaisses couches de liquide, il est en somme extrêmement difficile pour la plupart des espèces d'arriver à ce développement. Dans les liquides nutritifs sucrés l'acide carbonique développé au cours de la fermentation fera monter le mycélium jusqu'à la surface; ainsi, dans ces conditions la fermentation aide aux efforts de l'espèce pour former lesdits organes de reproduction. S'il se trouve, dans le liquide fermentescible, de la terre, des parties de végétaux ou d'autres particules, il devient encore plus facile pour le mycélium de former le fondement convenable du développement du sporange et de la zygospore. Toutefois, pour que la fermentation n'entrave pas ladite évolution, il faut que les conditions soient telles que l'acide carbonique développé vienne à être éliminé. Du reste, dans la nature libre il arrivera assez rarement que les cellules se trouvent dans des couches épaisses de liquide saccharifère.

Le sporange apparaît facilement sur tous les milieux ci-dessus mentionnés. Son développement exige une affluence abondante d'air humide et, pour que cet organe puisse se développer vigoureusement, il est nécessaire que la température soit assez élevée.

La zygospore, on le sait, prend naissance par le fusionnement de deux cellules; on conçoit généralement ce fusionnement comme un processus sexuel; mais on peut cependant aussi l'expliquer d'une autre façon. D'ailleurs, de telles spores apparaissent souvent sans l'intervention d'un pareil fusionnement, et on les appelle alors «azygospores». Dans la suite je me servirai de la désignation zygosporos pour l'un et l'autre cas.

La plupart des espèces de *Mucor* ne forment point du tout de zygosporos dans nos essais de laboratoire, de quelque façon que nous ayons varié la culture. Ceci est vrai ordinairement même pour les essais faits avec des espèces telles que le *Mucor Mucedo* et d'autres, chez lesquelles on a cependant parfois observé, et comme par hasard, la formation de zygosporos. Cependant les conditions nous sont dans tous ces cas restées inconnues jusqu'à ce jour. Comme Brefeld l'a signalé dernièrement (*Jahresber. der schles. Gesellsch. f. vaterländ. Cultur.* Décembre 1900), il ne se trouve parmi les nombreuses Mucorinées examinées jusqu'ici qu'une seule — savoir la *Sporodinia grandis* — chez laquelle la formation de zygosporos se présente presque avec la même régularité et avec la même fréquence que les autres organes de reproduction. Chez les autres espèces il la trouva très rarement ou point du tout. Klebs et Falck sont arrivés au même résultat. Nombre de mycologues ont étudié les Mucorinées durant de longues années sans observer une seule fois la formation de zygosporos.

On pourrait en conséquence être porté à croire — et c'est une opinion que l'on a émise comme vraisemblable — que la formation de zygospores était sur le point de disparaître. Au cours de mes recherches sur la circulation des microorganismes dans la nature, je fis l'observation que ladite formation se produit tout au contraire constamment et vigoureusement dans la nature, et que le sol est le lieu où l'on peut toujours trouver des espèces formant des zygospores. En effet, j'ai pu en constater la présence non seulement dans les échantillons provenant des environs de Copenhague, mais encore dans ceux récoltés dans les montagnes, au Culm du Blocksberg et en d'autres endroits du Harz, comme aussi dans les Alpes, où j'ai pris des échantillons un peu au-dessous de la région des neiges. Le *M. alpinus* provient des Alpes, le *M. neglectus* du Harz.

Quant aux conditions générales de la formation des zygospores, on peut dire qu'elles sont en général analogues à celles que j'ai énumérées plus haut en parlant de la formation des sporanges; cependant les zygospores exigent encore plus d'air que les sporanges.

Il présente un certain intérêt de considérer l'ordre suivant lequel les organes reproducteurs apparaissent; dans ce but, nous examinerons d'abord les végétations formées par nos trois espèces dans le moût de bière à 25°C. Les spores qui germent par des tubes germinatifs, commencent d'abord par former un mycélium dans ce liquide; ensuite vient la formation des gemmes et, chez les espèces bourgeonnantes, presque simultanément la formation des cellules de levure. Les spores de ces dernières espèces peuvent aussi, on se le rappelle, entrer immédiatement dans la voie du bourgeonnement, et dans ce cas l'évolution commence par conséquent par la formation de cellules de levure. En tous cas, le sporange et la zygospore viennent en dernier lieu. Pour ces deux organes de reproduction, l'ordre alterne selon les espèces. Chez le *M. alpinus* les sporanges se développent avant les zygospores, tandis que chez le *M. neglectus* c'est le contraire qui a lieu. Un milieu favorable au développement de sporanges et de zygospores sont de minces couches de gélatine au moût de bière ou de cette substance additionnée d'agar-agar, exposées à une température de 25°C. Dans ces conditions le *M. alpinus* forme de nombreux sporanges au bout de 3 jours, mais pas encore de zygospores; celles-ci ne se montrèrent que 1 ou 2 jours plus tard. Par contre, chez le *M. neglectus* j'ai trouvé déjà après 2 à 3 jours un riche développement de zygospores, tandis que les sporanges n'apparurent que 2 jour après.

Aussi bien que la formation de gemmes et de cellules de levure, le mycélium peut également se développer à l'infini sans que les organes supérieurs de reproduction se présentent; en ce sens, l'une de

ces formes d'évolution ne dépend pas de l'autre. J'ai déjà mentionné dans ce qui précède que durant plus de 9 mois j'ai fait engendrer des cellules de levure en renouvelant fréquemment le liquide nourricier, et qu'au moment où l'essai fut interrompu la formation de sporanges apparut immédiatement avec la force ordinaire, comme s'il ne s'était produit rien de particulier.

La formation de gemmes est fortement développée chez les trois espèces qui nous occupent, et chez deux d'entre elles en même temps la formation des cellules de levure. Qu'il y ait un développement un peu plus fort ou un peu plus faible des organes inférieurs de reproduction, ne semble pas avoir une influence sur le développement des organes supérieurs. La considération de nos trois espèces paraît indiquer que dans les rapports entre la formation des sporanges et celle des zygospores il y a lutte pour la place et pour les conditions de la vie. C'est un fait également connu pour les autres Champignons que les Mucorinées peuvent, elles aussi, être dirigées dans des directions exclusives d'évolution, de sorte que dans l'un cas c'est la formation de sporanges, dans l'autre celle de zygospores qui prédomine. Sous ce rapport, les *M. racemosus* et *M. neglectus* forment les points extrêmes; la première de ces deux espèces produit très vigoureusement des sporanges, mais d'un autre côté elle est en même temps du nombre de celles que nous ne pouvons pas amener à développer une seule zygospore; la seconde, par contre, se distingue par son abondante formation de zygospores, mais ne produit que peu de sporanges. Au milieu se trouve le *M. alpinus*.

Enfin nous considérerons les recherches relatives à l'influence de la température. Dans ces expériences j'ai pris comme semence des spores provenant de végétations jeunes et vigoureuses; le milieu nourricier était de la gélatine au moût de bière et additionnée d'agar-agar, en couches minces, et du moût, par couches en partie minces, en partie épaisses; l'une et l'autre substance étaient renfermées dans des flacons Freudenberg; le tube du capuchon de ceux-ci n'avait pas de coton, mais était prolongé par un tube courbé. Je pris soin que dans l'étuve il se trouvât une température constante et de l'air humide. Le but est de faire les expériences sous les conditions les plus favorables au développement des organes en question. Pour le mycélium et pour les cellules de levure, ces conditions sont à un degré éminent présentes dans le moût de bière, et il en est de même pour cette formation de chlamydospores qui se produit ici chez les espèces bourgeonnantes et que l'on a parfois dénommée gemmulation mycélienne. Sur le milieu solide, les conditions sont au contraire particulièrement favorables aux organes supérieurs de reproduction et également à la pro-

duction de gemmes, particulièrement pour la forme qui parfois s'appelle gemmes ou chlamydospores proprement dites. Les cultures dans ces deux substances se suppléent mutuellement. Pour que les zygo-spores et les sporanges puissent se produire, il faut qu'un mycélium aérien se développe. Il n'en apparaît ordinairement pas quand le milieu nourricier est couvert d'eau, même quand il n'y a qu'une couche fort mince. Voilà de quoi il faut se rendre bien compte dans ces expériences. De plus, il faut aussi se rappeler que les quatre catégories d'organes de reproduction apparaissent dans des temps différents, et qu'aux températures limites il peut y avoir de longs intervalles entre leur apparition. Aux températures élevées, la culture se fit dans le courant de 3 semaines; mais aux températures basses il fallut plus de 5 mois. Il va sans dire que pour ces recherches on se sert du microscope, et pour les zygosporos en outre d'une loupe. Quand les zygosporos sont rares, on ne peut souvent les découvrir qu'à l'aide de ce dernier instrument. Du moins pour la recherche préalable, la loupe est de beaucoup préférable au microscope.

Ci-dessous le tableau des résultats qu'ont donnés mes analyses:

	Maximum de température		Minimum de température	
	Mout de bière	Gélatine au mout de bière et additionnée d'agar-agar	Mout de bière	Gélatine au mout de bière et additionnée d'agar-agar
Mucor racemosus:				
Mycélium	32—33° C.	32—33° C.	1/2° C.	1/2° C.
Cellules de levure ..	32° -	32° -		
Gemmes	32° -	32° -		1/2° -
Sporanges.....		31—32° -		3—1/2° -
Mucor alpinus:				
Mycélium	29—31° -	29—31° -	1/2° -	1/2° -
Cellules de levure ..	29—31° -	29—30° -	1/2° -	1/2° -
Gemmes	29—31° -	29—30° -	1/2° -	1/2° -
Sporanges.....		27° -		1—1/2° -
Zygosporos.....		25—26° -		3° -
Mucor neglectus:				
Mycélium	33° -	33° -	3° -	3° -
Gemmes	30—31° -	32° -	3—4° -	3—4° -
Sporanges.....		29° -		3—4° -
Zygosporos.....	32° -	32° -		3—4° -

Chacune des espèces avait dans ces deux substances les mêmes températures limites pour la croissance végétative. La température

maxima la plus élevée était de 33°C ., la température minima la plus basse, de $1/2^{\circ}\text{C}$. En comparant les espèces, nous trouvons, comme nous devions nous y attendre, que leurs températures limites forment des caractères capables de servir à les distinguer entre elles.

Les formations de gemmes et de cellules de levure, peuvent se présenter aux températures limites pour le développement végétatif ou dans le voisinage de ces températures: c'est que, en effet, ces formations se rapprochent beaucoup du système végétatif. Toutefois, la formation de cellules de levure chez le *M. racemosus* ne semble pas avoir lieu aux températures les plus basses; en tout cas, dans une assez grande série de cultures, je n'ai pu les observer à des températures inférieures à 6°C . En somme, il existe une grande irrégularité dans l'apparition des gemmes et des cellules de levure près des températures limites, et cela a lieu aussi bien du côté des maxima que de celui des minima. Il arrive souvent que les organes de reproduction proprement dits: sporanges et zygosporos, se sont développés ici sans signe apparent que les chlamydosporos et les cellules de levure allaient apparaître.

Pour toutes les trois espèces, la température maxima pour la formation des sporanges et des zygosporos est un peu inférieure à la température maxima de la croissance végétative, de sorte qu'il y a concordance avec les observations que j'ai faites antérieurement sur d'autres champignons. La température minima pour les deux organes susnommés chez le *Mucor neglectus* est très rapprochée de la température minima de la croissance végétative, tandis que pour les deux autres espèces il se manifeste sous ce rapport une différence nettement prononcée. En ce qui concerne les relations entre les températures limites des organes supérieurs de reproduction, le tableau montre que ces relations alternent selon les espèces. La formation de sporanges chez le *M. alpinus* a une température maxima supérieure à celle des zygosporos, tandis que chez le *M. neglectus* c'est l'inverse qui a lieu.

Les tableaux donnent un aperçu de mes expériences principales; à côté de celles-ci, j'ai également fait des essais avec les trois espèces sur du moût de bière additionné de 14 pour cent de gélatine, mais seulement aux températures basses, puisque cette substance se fond aux températures plus élevées, — et avec les *M. racemosus* et *M. alpinus* sur du pain de seigle presque aux mêmes températures que celles indiquées dans le tableau. Le pain se prête moins bien à des expériences principales, parce que, surtout aux hautes températures, la formation de zygosporos ne se produit pas ici avec vigueur. La gélatine

au moût de bière fut, de même que le moût de bière additionné non seulement de gélatine mais encore d'agar-agar, placé par minces couches dans les flacons mentionnés. Le pain remplissait, par contre, un quart du flacon. Au reste, ces essais furent réalisés suivant le même procédé que ceux exposés précédemment.

Sur le pain, la croissance végétative des *M. racemosus* et *M. alpinus* eut une température maxima un peu plus basse que sur la gélatine au moût additionnée d'agar-agar et dans le moût, mais la même température minima, savoir $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Le minimum de température pour le développement de ces deux espèces sur la gélatine au moût se trouve également être de $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Le *M. neglectus*, sur la gélatine au moût avait sa limite minimum à 3°C . Par conséquent, cette espèce, elle aussi, avait ici le même minimum de température que sur la gélatine au moût additionnée d'agar-agar et dans le moût. Les énoncés dérivés de mes expériences avec la gélatine au moût additionnée d'agar-agar et avec le moût, furent confirmées par les essais faits avec le pain et avec la gélatine au moût. Le résultat le plus important apportés par ces derniers fut qu'ici il se manifesta encore plus clairement que dans la première série que les organes supérieurs de reproduction peuvent dans certaines conditions de culture se développer au minimum de température pour la croissance végétative. Ainsi, dans les cultures faites sur le pain, les *M. racemosus* et *M. alpinus* avaient une température minima, tant pour la formation des sporanges que pour celle du mycélium, d'environ $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$., et il en était de même pour la dernière espèce dans la culture sur la gélatine au moût.

Les températures limites de la croissance végétative et du développement du sporange chez le *M. racemosus* ont aussi été déterminées par Klebs et enregistrées dans son travail cité plus haut. Cet auteur trouva que pour la croissance la température maxima est de $32-33^{\circ}\text{C}$. et la température minima de $4-5^{\circ}\text{C}$., et que pour la formation des sporanges le maximum de température se trouve être $30-31^{\circ}$, le minimum de $6-7^{\circ}\text{C}$. Comme milieu nutritif il employa du moût de raisins additionné d'agar-agar. La description qu'il donne de ladite espèce concorde avec mes observations; il en est de même aussi, pour le fond, quant aux températures maxima trouvées par lui; mais en ce qui concerne les températures minima, il y a au contraire une très grande différence, aussi quand la comparaison se borne à la substance qui dans mes analyses avait la plus grande analogie avec la sienne, à savoir la gélatine au moût de bière additionnée d'agar-agar. Suivant Klebs, il n'y a pas de croissance à une température inférieure à 4°C ., tandis que dans mes expériences elle se continuait encore à

$1/2^{\circ}$ C. Dans celles faites par moi sur la gélatine au moût additionnée d'agar-agar, la formation de sporanges se produisait encore à 3° C. et une fois même au-dessous, tandis que chez Klebs elle s'arrêtait déjà à 6° C. La raison de ces grandes différences se trouve sûrement dans le fait qu'il a interrompu ses expériences à une phase prématurée. Ayant constaté que la formation de sporanges ne se montrait pas à $4-5^{\circ}$ C. après 8 jours, il en conclut qu'elle ne se produira plus du tout; mais cela n'est pas exact. Le développement aux températures basses se fait beaucoup plus lentement; il y a ici dans ces recherches un élément qui en augmente à un haut degré la difficulté, mais que nous devons prendre en très grande considération. Je trouvai qu'à basse température l'analyse ne peut, en règle générale, être terminée qu'après un temps variant entre 5 et 6 mois.

J'ai mentionné dans le premier chapitre du présent mémoire comment les recherches que j'ai faites en 1886 donnèrent pour résultat que la température maxima de la croissance végétative des *Saccharomycètes* est supérieure à celle de la formation des spores. Les essais que je fis pour m'orienter sur d'autres groupes de champignons, me firent penser qu'il y avait là une règle générale s'appliquant à l'ensemble des Champignons; je mis en avant cette idée dans mon travail précité sur l'*Anixiopsis*. Dans son traité sur la physiologie des organes de reproduction chez les Champignons, Klebs adopta cette hypothèse en lui donnant de suite une extension considérable: il posa en règle générale que l'organe relativement plus compliqué de reproduction aurait une température maxima plus basse que l'organe plus simple. En ce qui concerne les *Mucorinées*, il entend par la première de ces expressions la zygospore, et par la seconde le sporange. Cependant, pour prouver la justesse de son assertion, il ne peut s'appuyer que sur un cas unique, à savoir les essais qu'il a faits sur la *Sporodinia grandis*. Chez le *M. racemosus* la formation de zygospores, on se le rappelle, ne se produisait pas du tout. Quant au minimum de température, il est porté à croire que des règles correspondantes se trouveront également valables.

Mes expériences ci-dessus décrites sur les *M. racemosus*, *M. alpinus* et *M. neglectus*, n'ont pas confirmé l'exactitude de l'opinion de Klebs, mais ont montré qu'il faut ramener la thèse à la forme que je lui ai donnée. Ce n'est qu'ainsi qu'elle peut avoir une application générale.

Avril 1902.

Dosage de petites quantités d'arsenic dans les matières organiques, spécialement dans la bière et dans le moût.

Examen comparé des méthodes diverses de doser l'arsenic.

Par

Carl Pedersen.

En l'automne de 1900, un assez grand nombre de personnes en Angleterre et au pays de Galles qui avaient pris des bières fortement arsénicales, furent empoisonnées. Au mois de février 1901, une commission royale fut nommée dans le but de faire une enquête sur ces cas très sérieux d'empoisonnement. M. Whitelegge, membre de cette commission, s'est adressé à M. Harald Faber, conseiller agronomique du Danemark à Londres, pour obtenir, par son intermédiaire, des renseignements sur l'expérience faite en Danemark à l'égard de la bière arsénicale. M. Faber s'étant adressé à la brasserie de Gamle Carlsberg, la direction de la brasserie a demandé à la section de chimie du Laboratoire de Carlsberg de faire des recherches à ce sujet.

Par suite de cette demande M. S.-P.-L. Sørensen, chef de la section, m'a chargé d'entreprendre une série de recherches dont voici les résultats:

1. Introduction.

La détermination de l'arsenic dans les matières organiques se fait naturellement au moyen de deux opérations: 1° la séparation de l'arsenic d'avec les matières organiques; 2° le dosage de l'arsenic.

Les différentes méthodes proposées pour séparer l'arsenic de la matière organique se divisent en trois groupes principaux:

1° La méthode d'oxydation: on oxyde la matière organique au moyen d'agents d'oxydation vigoureux, dont les plus importants sont

le permanganate de potassium, l'acide sulfurique concentré, l'acide nitrique et l'acide sulfurique forts, le chlorate de potassium et l'acide chlorhydrique, ou, par voie sèche, la fusion avec du salpêtre.

2° La méthode de précipitation de Reinsch¹⁾: on précipite l'arsenic de la solution qui contient les matières organiques en faisant bouillir le liquide chlorhydraté avec du cuivre poli. Pendant l'ébullition l'arsenic se déposera sur le cuivre comme un dépôt noir.

3° La méthode de distillation (MM. Schneider et Fyfe²⁾, modifiée par MM. E. Fischer³⁾, Hager⁴⁾, et d'autres): en faisant bouillir la matière à analyser avec l'acide chlorhydrique et le protochlorure de fer l'arsenic se dégage par distillation sous la forme de trichlorure d'arsenic.

Après avoir séparé l'arsenic de la matière organique par un de ces procédés, on le caractérise et le dose de différentes manières: le plus souvent dans l'appareil Marsh-Berzelius ou l'appareil Fresenius-Babo⁵⁾, quelquefois par précipitation avec de l'hydrogène sulfuré, plus rarement par d'autres procédés.

En combinant ces méthodes, il s'est développé, peu à peu, un nombre de procédés généralement reconnus pour ces recherches aux différents pays.

En Danemark, on suit, en grande partie, pour reconnaître l'arsenic, les règles adoptées par la Chemisk Forening (la Société de chimie) de Copenhague le 28 mai 1886⁶⁾. On oxyde les matières organiques et les détruit soit en chauffant avec du chlorate de potassium et de l'acide chlorhydrique, soit en fondant avec de l'azotate de potassium, soit, ce qui est le plus facile, par le procédé indiqué par M. H. Reddelien⁶⁾, en faisant agir, à la température ambiante, sur la matière à oxyder du permanganate de potassium solide et de l'acide sulfurique concentré. Quelle que soit la méthode appliquée pour la destruction des matières organiques, on met la liqueur qui en résulte dans un appareil de Marsh d'une construction particulière.

En Allemagne⁷⁾, la loi du 10 avril 1888 prescrit un procédé à suivre pour reconnaître l'arsenic et l'étain dans les aliments: on oxyde la matière avec du chlorate de potassium et de l'acide chlorhydrique; on précipite la solution avec de l'hydrogène sulfuré. Le trisulfure d'arsenic précipité est dissous dans du sulfure d'ammonium.

¹⁾ Journ. f. pr. Chem. XXIV, 244 (1841).

²⁾ Journ. f. pr. Chem. LV, 103 (1852).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesell. XIII, 1778 (1880).

⁴⁾ Ref. Zeitschr. f. anal. Chem. XXI, 308 (1882).

⁵⁾ W. Fresenius: Zeitschr. f. anal. Chem. XX, 522 (1881).

⁶⁾ Tidsskrift for Physik og Chemi VII, 130 (1886).

⁷⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. XXVII, 471 (1888).

jaune. La solution obtenue est traitée avec de l'acide azotique concentré, et évaporée à sec. Le résidu est fondu avec du carbonate de sodium et du salpêtre. On précipite l'extrait aqueux avec du molybdate d'ammonium. Le précipité est dissous dans de l'ammoniaque liquide étendue. La solution est précipitée avec du chlorure ammoniaco-magnésien. Le précipité d'arséniate ammoniaco-magnésien est dissous dans un peu d'acide azotique étendu. Pour reconnaître l'arsenic, on se sert de l'azotate d'argent, qui donne un précipité brun rouge d'arséniate d'argent, ou bien on rend une goutte de la solution, placée sur une lame porte-objet, faiblement alcaline avec de l'ammoniaque. Si la solution contient de l'arsenic, il se formera, sous peu, un précipité cristallin d'arséniate ammoniaco-magnésien et qui est facilement reconnaissable sous le microscope.

En Suède¹⁾, pour reconnaître l'arsenic, on applique, suivant la loi du 10 avril 1885, la méthode de distillation avec de l'acide chlorhydrique et du protochlorure de fer. On précipite la liqueur distillée avec de l'hydrogène sulfuré, et la sulfure d'arsenic est réduit avec du cyanure de potassium et du carbonate de sodium d'après le procédé de Fresenius et de Babo.

En Angleterre, pour les recherches étendues de bières faites, depuis quelques années, pour y reconnaître l'arsenic, on s'est servi surtout de méthodes donnant des résultats en peu de temps et sans trop de peine. Ainsi MM. A. Chapman²⁾, Alfred H. Allen³⁾, E. Jones⁴⁾ et The Commission to the Manchester Brewers' Association⁵⁾ ont indiqué différentes méthodes qui, toutes, ont recours, d'après Reinsch, au dépôt d'arsenic fait sur du cuivre poli, en portant à l'ébullition la bière arsénicale avec une toile métallique de cuivre poli. On caractérise l'arsenic déposé tantôt par sublimation à l'état d'anhydride arsénieux, reconnaissable sous le microscope (MM. Chapman, Allen et Commission), tantôt par pesage à l'état de sulfure (M. E. Jones). MM. W. Thomson et J. P. Shenton⁶⁾, au contraire, oxydent la bière au moyen d'acide nitrique et d'acide sulfurique concentrés. Après avoir évaporé l'acide nitrique, ils introduisent la solution dans l'appareil de Marsh. Enfin M. F. C. J. Bird⁷⁾, en recherchant l'arsenic dans la bière, a employé la réaction de Gutzeit avec du chlorure mercurique.

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. XXXIV, 88 (1895).

²⁾ The Analyst, XXVI, 8 (1901).

³⁾ ibid. XXVI, 10 (1901).

⁴⁾ ibid. Ref. XXVI, 158 (1901).

⁵⁾ ibid. XXVI, 13 (1901).

⁶⁾ ibid. Ref. XXVI, 213 (1901).

⁷⁾ ibid. XXVI, 181 (1901).

Après avoir appliqué exactement ces méthodes à quelques essais d'orientation et de comparaison préalables, faits avec de la bière dans laquelle ont été introduites des quantités connues d'arsenic, j'ai bien vite reconnu que tous ces procédés n'étaient pas également exacts les résultats en variant beaucoup. C'est ce que confirment aussi les résultats publiés par la Royal Commission on Arsenical Poisoning, nommée à l'occasion des empoisonnements par l'arsenic très graves en Angleterre.

Voici ce qu'on lit dans le rapport officiel de la Commission, remis au Gouvernement :

„Conclusion as to the exact amount of arsenic present in the inculpatated beers is rendered difficult by the fact that different analysts have employed different methods which in some instances have produced very divergent results when applied to samples of the same beer. We propose to make further inquiry into the relative value of different quantitative tests for arsenic in beer, as to the most trustworthy methods to recover all the arsenic present in a given sample of beer, and as to the possible existence of arsenic in beer in some combination with organic matter in which it might escape determination by certain of the tests commonly employed.“

A mon avis les pages suivantes contribueront à la solution des questions posées dans ce rapport¹⁾.

2. L'appareil de Marsh.

Avant de juger par des expériences les différents procédés pour séparer l'arsenic des matières organiques, il était nécessaire de choisir une méthode de caractérisation de l'arsenic le plus quantitative possible. Il fallait une méthode dont les réactions se fissent suivre et contrôler facilement. La méthode une fois établie, sa précision et sa sensibilité trouvées, il serait possible de comparer les valeurs relatives des procédés différents pour doser l'arsenic dans les matières

¹⁾ Après que ces recherches étaient, pour la plus grande partie, terminées, un traité a paru dans le journal „The Analyst“ XXVII, 48 (1902) sous le titre suivant: „Report of the conjoint Committee on the Detection and approximate Estimation of minute Quantities of Arsenic in Beer, Brewing Materials, Food-stuffs and Fuels.“ Il s'ensuit de ce rapport que le Comité, composé de MM. Otto Hehner, Alfred H. Allen, Alfred C. Chapman, C. Estcourt, David Howard, Arthur R. Ling, Rudolph Messel, Leonard T. Thorne, a choisi, comme le meilleur procédé, une méthode assez semblable à celle dont je me suis servi. Les écarts des deux méthodes ressortiront des observations faites plus loin (voir pp. 114, 124).

organiques. On trouverait ainsi la méthode de dosage la plus exacte parmi celles qu'on aura soumises à l'examen.

Parmi les méthodes pour rechercher des quantités minimales d'arsenic, au-dessous d'un milligramme, le procédé de Marsh-Berzelius et celui de Fresenius-Babo sont les plus en usage. Ils présentent l'avantage d'être simples et d'exécution facile, et les dimensions de l'anneau d'arsenic donnent d'une manière excellente la mesure de la quantité d'arsenic.

De ces méthodes, celle de Marsh-Berzelius est la plus expéditive et la plus commode quand l'arsenic se trouve en solution. C'est aussi la méthode qui sert de base à ce travail.

En se servant de l'appareil de Marsh il importait, tout d'abord, d'examiner les éléments qui en déterminent la sensibilité et l'application sûre. En effet, pour pouvoir servir au dosage de l'arsenic l'appareil doit toujours donner des anneaux d'arsenic de dimensions absolument égales pour les mêmes quantités d'arsenic des essais parallèles. C'est là un fait que, jusqu'à présent, on n'a pas suffisamment reconnu. Avec un tel appareil on pourrait former, au moyen de quantités connues d'arsenic, une échelle d'anneaux d'arsenic qui pût servir de module aux recherches postérieures.

L'appareil de Marsh le plus convenable et le mieux fait pour satisfaire aux conditions exposées plus haut est l'appareil modifié représenté ci-dessous et auquel on a donné la forme adoptée par la Chemisk Forening de Copenhague en 1886¹⁾.

Pour produire le dégagement de l'hydrogène on se sert d'un flacon ordinaire de 300^{cc}, fermé d'un bouchon de caoutchouc à deux trous. L'un des trous reçoit un entonnoir séparateur à robinet de 100^{cc}, l'autre reçoit un tube à dégagement, par où s'échappe l'hydrogène.

L'hydrogène se débarrasse des gouttelettes d'eau qu'il peut entraîner en passant par de l'acide sulfurique contenu dans une éprouvette à pied haute de 12^{cm} et qui est munie d'un bouchon de caoutchouc²⁾ à deux trous qui reçoivent le tube adducteur et le tube abducteur de l'hydrogène.

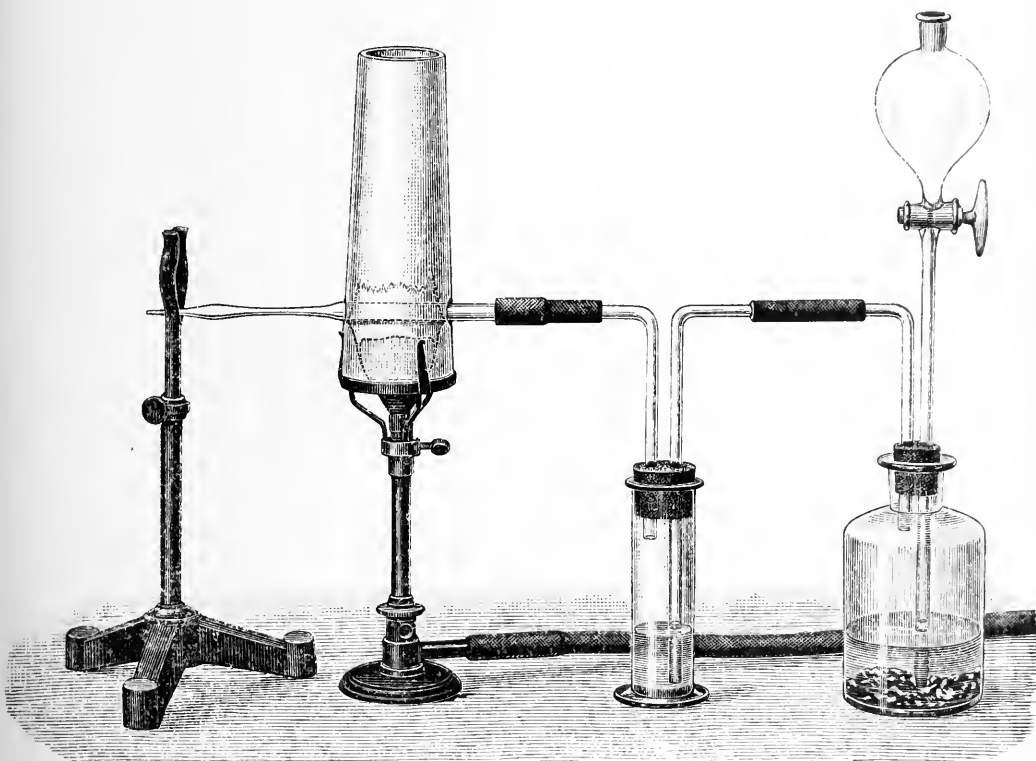
De là, on fait passer l'hydrogène et l'hydrogène arsénié à travers le tube d'essai, tube de verre peu fusible de 10^{mm} de diamètre. Une portion de ce tube est étranglée ayant 3^{mm} de diamètre à l'extérieur. Au moyen d'un bec Bunsen on maintient au rouge sombre

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ On s'est assuré, par des essais, que l'emploi de bouchons de caoutchouc ne présente aucun inconvénient. Avant l'usage les bouchons, ainsi que les tubes de caoutchouc, ont été lavés à la lessive de soude.

la partie du tube immédiatement devant l'endroit étranglé. Pour concentrer la chaleur, le bec est muni d'un couronnement à jet éventail et d'une cheminée en terre percée en deux endroits diamétralement opposés et par où on fait passer le tube d'essai.

L'usage de l'appareil démontrait qu'il est très important de maintenir au rouge sombre le tube d'essai, sans pourtant chauffer de manière à le faire fondre, ce qui arrivera facilement si on donne toute la



flamme. En effet, si le tube n'est pas maintenu au rouge, la décomposition de l'hydrogène arsénié en arsenic et en hydrogène est incomplète. C'est ce qui arrivait quand on avait placé le tube d'essai assez bas pour lui faire toucher la partie froide de la flamme du bec. Pour empêcher la pointe du tube de s'incliner pendant le chauffage, on le soutient ainsi que fait voir la figure.

Nous avons déjà dit que, pour dessécher l'hydrogène, on se sert de l'acide sulfurique concentré. On sait que cet acide décompose l'hydrogène arsénié en hydrogène et en arsenic, prenant en même temps une teinte brune. C'est pour cette raison, sans doute, que des chimistes ont proposé l'emploi du chlorure de calcium ou d'un mélange de chlorure de calcium et d'hydrate de potassium solide pour opérer la dessiccation¹⁾.

Pour décider la question: laquelle de ces trois méthodes de des-

¹⁾ R. Otto: Anleitung zur Ausmittelung der Gifte. Braunschweig 1896. P. 187.

siccation est la meilleure, on a fait les essais parallèles suivants, en plaçant les dessiccatifs solides dans des tubes en U. Les conditions étaient identiques. Le dégagement de l'hydrogène se faisait au moyen de zinc et d'acide sulfurique mis dans le flacon de dégagement.

Le flacon de dégagement contenait ¹⁾	La dessiccation de l'hydrogène se faisait au moyen		
	d'acide sulfurique concentré	de chlorure de calcium	d'un mélange de chlorure de calcium et d'hydrate de potassium
$\frac{1}{100}$ mg d'As	anneau d'arsenic bien prononcé	—	—
$\frac{1}{50}$ mg d'As	anneau d'arsenic plus distinct	teinte brune à peine visible	pas de trace
$\frac{1}{30}$ mg d'As	anneau d'arsenic encore plus distinct	anneau brun bien prononcé dans la portion étranglée du tube	trace à peine visible

Ces essais, qui ont été répétés avec le même résultat, ont démontré à l'évidence que l'acide sulfurique concentré est bien préférable, comme agent de dessiccation, aux deux corps solides, qui retenaient des quantités considérables d'hydrogène arsénié. L'acide sulfurique présente encore un avantage. Il permet de suivre et de contrôler la vivacité du dégagement de l'hydrogène, ce qui est une condition essentielle pour obtenir l'uniformité des essais. Les agents solides, au contraire, ne donnaient aucune indication de la marche trop vive du dégagement d'hydrogène ni de son arrêt complet. Enfin, si on emploie l'acide sulfurique, l'anneau d'arsenic se dépose toujours au même endroit du tube, et ce dépôt est plus uniforme qu'à l'emploi des agents solides. Mais plus le dépôt est régulier, plus il est facile de comparer les différents anneaux d'arsenic.

Les essais ont été faits de la manière suivante: après avoir introduit dans le flacon de dégagement d'hydrogène 20^{gr} de zinc pur, on y ajouta, par l'entonnoir séparateur, cinq gouttes d'une solution de sulfate de cuivre normale et puis après 100^{cc} d'acide sulfurique²⁾

¹⁾ Dans ces expériences, ainsi que dans tous les essais suivants, on additionnait l'arsenic sous la forme d'une solution aqueuse d'anhydride arsénieux. La solution contenait $\frac{1}{100}$ milligramme d'As dans 1 centimètre cube, donc 0.^{gr}01 d'As = 0.^{gr}0132 d'anhydride arsénieux (As⁴ O⁶) dans 1 litre.

²⁾ Le Conjoint Committee déjà nommé, au contraire, se sert d'acide chlorhydrique pour produire le dégagement d'hydrogène dans l'appareil

étendu (1 volume d'acide sulfurique concentré + 7 volumes d'eau). Au bout de 13 minutes on alluma le bec de gaz; au bout de 15 ou 16 minutes on additionna la solution arsénicale par l'entonnoir séparateur. Au bout d'une heure et demie on arrêta l'expérience, tout l'hydrogène arsénié étant chassé de l'appareil.

Pour ces essais on n'employait que du zinc pur; pour s'assurer d'un produit absolument uniforme, le zinc était fondu et granulé. L'acide sulfurique était l'acide pur du commerce. A chaque nouvelle série d'essais on faisait, en même temps, un dosage de contrôle avec le zinc et l'acide sulfurique seuls. Ces dosages de contrôle ne donnaient qu'une trace à peine visible d'anneau d'arsenic et qui était de beaucoup plus petite que celle correspondant à $\frac{1}{200}$ mg d'As. Néanmoins ces dosages de contrôle doivent toujours se faire pour pouvoir entrer en compte, s'il y a lieu.

L'acide sulfurique n'attaquant pas le zinc pur, on avait recours à différents moyens pour mettre en train le dégagement d'hydrogène: on additionnait du sulfate de cuivre, de l'acide chloroplatinique, du fer. Dans ce dernier cas, on fondait le zinc avec de la poudre de fer en agitant avec une barre de fer. Les autres réactifs étaient introduits au flacon de dégagement.

Voici les résultats des essais faits avec ces méthodes en employant, à chaque essai, $\frac{1}{10}$ mg d'As:

1) Avec du sulfate de cuivre:

Nos. d'ordre	Addition de Cu SO^4 normal	Le dégagement d'hydrogène était en bon train	Le dégagement d'hydrogène était	L'anneau d'arsenic était
1	2 gouttes	au bout de 30 minutes	régulier	plus petit qu'en 2
2	5 —	- — - 13 —	beau, régulier	le plus grand
3	20 — = 1 ^{cc}	- — - 10 —	assez vif	égal à 1
4	5 ^{cc}	- moins - 10 —	trop vif	moins grand qu'en 1 (odeur forte d'hydrogène arsénié)

de Marsh ayant trouvé qu'en se servant de l'acide chlorhydrique on est, en général, à même d'essayer directement dans l'appareil de Marsh une solution contenant des matières organiques. Il déclare encore avoir obtenu un anneau d'arsenic un peu plus grand pour la même quantité d'arsenic en employant l'acide chlorhydrique au lieu de l'acide sulfurique. Pour débarrasser l'hydrogène dégagé de l'eau entraînée The Conjoint Committee emploie du chlorure de calcium et non pas, comme moi, de l'acide sulfurique.

Ainsi en employant le sulfate de cuivre, l'addition de 5 gouttes de sulfate de cuivre normal donnait le meilleur résultat. Si on ajoutait une quantité moins grande, l'anneau d'arsenic était plus petit, et il fallait un temps relativement trop long avant que le dégagement d'hydrogène eût assez de vivacité pour qu'on pût allumer le bec de gaz, tandis qu'une quantité plus grande, telle que 1^{re} ou au-delà, produisait un dégagement d'hydrogène trop vif, ce qui empêchait en partie la décomposition de l'hydrogène arsénié au tube chauffé au rouge.

2) Avec de l'acide chloroplatinique on avait le meilleur résultat en ajoutant 2 gouttes d'une solution de 5 p. c. d'acide chloroplatinique. Cette quantité donnait le plus beau dégagement d'hydrogène et le plus grand anneau d'arsenic. L'effet était presque tout-à-fait le même qu'avec 5 gouttes de sulfate de cuivre. Déjà en ajoutant 5 gouttes d'acide chloroplatinique, le dégagement d'hydrogène devenait trop vif, et l'anneau d'arsenic diminuait.

3) En se servant de zinc fondu avec de la poudre de fer, le dégagement d'hydrogène se faisait avec la même vivacité que pour 5 gouttes de sulfate de cuivre normal, mais l'anneau d'arsenic devenait moins grand. Si au zinc mélangé avec du fer on ajoutait 5 gouttes de sulfate de cuivre normal, l'anneau d'arsenic s'agrandissait, mais sans obtenir les dimensions obtenues par du zinc pur.

4) A ces essais on en ajouta un autre en se servant de zinc pur sans addition d'autres réactifs pour accélérer le dégagement d'hydrogène. Dans ce cas il fallait 2 heures avant que le dégagement d'hydrogène fût assez avancé pour qu'on pût allumer le bec de gaz. De plus, l'expérience durait 2 heures. Le résultat en était que l'anneau d'arsenic devenait moins grand que dans tous les autres essais. Il était plus petit même que l'anneau obtenu en se servant de zinc mélangé de fer et sans addition de sulfate de cuivre.

Ainsi l'assertion que quelques gouttes de sulfate de cuivre diminueraient l'anneau d'arsenic, par suite de la combinaison d'une partie de l'arsenic avec le cuivre, ne paraît pas absolument exacte dans le cas où il s'agit d'aussi petites quantités que 5 gouttes de sulfate de cuivre normal.

Dans ces dosages il était d'importance de renouveler l'acide sulfurique du flacon laveur à chaque essai. En effet, si on s'en servait pour des essais consécutifs, l'anneau que formait la même quantité d'arsenic allait en grandissant. La cause en était, sans doute, que l'acide sulfurique, plus dilué aux derniers essais, ne décomposait pas autant d'hydrogène arsénié qu'aux premiers. Il arrivait même que l'hydrogène arsénié absorbé aux essais antérieurs était rendu lorsque l'acide sulfurique se diluait.

Après avoir constaté ces faits, on pouvait passer à l'établissement

d'une échelle normale d'anneaux d'arsenic correspondant à des quantités connues d'arsenic. On établissait deux échelles en prenant de la solution d'anhydride arsénieux indiquée plus haut des quantités de 40, de 20, de 10, de 5, de 3.3, de 2, de 1, de $\frac{1}{2}$ cc correspondant respectivement à $\frac{2}{5}$, à $\frac{1}{5}$, à $\frac{1}{10}$, à $\frac{1}{20}$, à $\frac{1}{30}$, à $\frac{1}{50}$, à $\frac{1}{100}$, à $\frac{1}{200}$ milligramme d'arsenic. Dans l'une des séries on amena le dégagement d'hydrogène par 5 gouttes de sulfate de cuivre normal, dans l'autre on se servit dans ce but de 2 gouttes d'acide chloroplatinique. La comparaison des deux séries était à l'avantage du sulfate de cuivre, quoique la différence ne fût que minime. Aussi se servait-on de sulfate de cuivre à tous les essais postérieurs.

On conserva les tubes, dont le bout effilé était fermé à la cire d'Espagne, pour servir d'échelle normale aux essais postérieurs.

Ces séries ont montré qu'on pouvait distinguer nettement des quantités de $\frac{2}{5}$ mg à $\frac{1}{200}$ mg d'As avec les intermédiaires indiqués plus haut. Comme des essais faits dans des appareils différents avec des quantités égales d'arsenic donnaient des anneaux d'arsenic égaux, on est en droit de dire que la méthode sous cette forme, qui est presque identique aux règles établies par la Chemisk Forening de Copenhague en 1886, satisfait à toutes les exigences raisonnables relatives à la sensibilité, à l'exactitude, à l'exécution rapide et facile au dosage de petites quantités d'arsenic.

3. Méthodes d'oxydation.

La méthode de dosage au moyen de l'appareil de Marsh établie et essayée ainsi que nous venons de le dire, permet la comparaison et le jugement des méthodes énumérées dans l'introduction et servant à séparer l'arsenic des matières organiques. De toutes les méthodes d'oxydation la méthode de M. H. Reddelien¹⁾, employant le permanganate de potassium et l'acide sulfurique concentré, est la plus rapide et la plus facile à appliquer.

On introduit la matière à examiner dans un ballon de 750 cc. On ajoute, si la matière pèse moins de 6 grammes, 20 cc d'eau et du permanganate de potassium solide d'une fois et demie le poids de la matière. On agite bien le mélange et, au bout de quelques minutes, on additionne 25 cc d'acide sulfurique concentré, qu'on fait descendre avec précaution le long des parois du ballon. Au bout de quelques minutes l'oxydation est achevée. On remplit d'eau jusqu'à environ 130 cc. On décolore avec un peu d'acide oxalique, ou on porte la matière directement à l'appareil de Marsh.

¹⁾ Loc. cit.

Ce procédé permet de se servir de 50^{cc} de bière de conserve pour faire le dosage de l'arsenic. Avec des quantités de bière plus grandes, le liquide oxydé devient d'un volume trop grand pour être introduit dans l'appareil de Marsh décrit ci-dessus. Pour achever l'oxydation de 50^{cc} de bière il faudra 12^{gr} de permanganate de potassium solide et 25^{cc} d'acide sulfurique concentré. Ayant achevé l'oxydation, on remplit jusqu'à 100^{cc} et décolore au moyen de 2—3 grammes d'acide oxalique solide, ce qui correspond à 1—1½ gramme de K Mn O^4 . Le liquide limpide comme de l'eau est examiné à l'appareil de Marsh.

Voici le résultat d'essais répétés :

Addition d'As	Anneau d'arsenic
Contrôle: 12 ^{gr} K Mn O^4 + 25 ^{cc} H^2SO^4 + 9 ^{gr} d'acide oxalique	aucun
50 ^{cc} de bière	—
50 ^{cc} - — + $\frac{1}{100}$ ^{mg} d'As	—
50 ^{cc} - — + $\frac{1}{20}$ ^{mg} —	< $\frac{1}{200}$ ^{mg} d'As
25 ^{cc} - — + $\frac{1}{20}$ ^{mg} —	env. $\frac{1}{100}$ ^{mg} —

Il faut remarquer que souvent ces essais échouaient. En effet, le liquide oxydé contenant des quantités de sulfate de potassium et de sulfate manganoux tend, dans l'appareil de Marsh, à former de l'écume si le dégagement d'hydrogène est très vif, ce qui est le cas lorsque le contenu d'As du liquide atteint $\frac{1}{20}$ ^{mg}. Cette formation d'écume était tellement forte à quelques-uns des essais que le contenu débordant se rendait au flacon laveur et de là au tube d'essai chauffé au rouge. Le tube éclatait. L'essai était manqué.

Comme il est difficile de montrer $\frac{1}{20}$ ^{mg} d'arsenic en 50^{cc} de bière et que la réaction de $\frac{1}{20}$ ^{mg} d'arsenic en 25^{cc} de bière n'est que de $\frac{1}{100}$ ^{mg} d'arsenic, ou à peu près, cette méthode, malgré sa grande simplicité, n'est pas satisfaisante aux dosages d'arsenic dans la bière. Elle n'est pas suffisamment sensible. Dans de telles recherches il faut une sensibilité assez grande pour qu'on puisse indiquer avec certitude $\frac{1}{100}$ ^{mg} d'arsenic contenu en 100^{cc} de bière, ainsi que c'est le cas pour la méthode d'oxydation au moyen de l'acide nitrique (v. plus loin).

Ajoutons que le dosage d'arsenic en la bière ne peut pas se faire en introduisant la bière directement à l'appareil de Marsh. En effet, si on porte 50^{cc} de bière de conserve ou davantage à l'appareil directement, le contenu débordera en écumant. Si on évapore la bière jusqu'à la moitié de son volume, on pourra en introduire 75^{cc} sans débordement d'écume, mais le dégagement d'hydrogène s'arrêtera vite

sans reprendre, même après l'addition de 10^{cc} d'acide sulfurique concentré. A des essais où on avait ajouté $\frac{1}{20}$ ^{mg} d'arsenic à la bière, il ne se produisait au tube qu'une trace à peine visible de dépôt.

L'oxydation par l'acide sulfurique concentré d'après Kjeldahl¹⁾ ou par l'électrolyse dans un liquide fortement sulfaté d'après MM. Budde et Schou²⁾ demande un temps démesurément long s'il s'agit d'aussi grandes quantités que de 50 à 100^{cc} de bière. Elle demande aussi pas mal de surveillance, la matière tendant à déborder en écumant.

L'oxydation par le chlorate de potassium et l'acide chlorhydrique, recommandée par beaucoup de chimistes, ne convient pas à ces essais, auxquels il s'agissait de quantités d'arsenic très petites, l'acide chlorhydrique du commerce, soi-disant exempt d'arsenic, contenant des quantités notables d'arsenic dans le volume d'acide qu'il faut employer. Pour se servir de l'acide chlorhydrique, il faudrait donc produire soi-même l'acide nécessaire aux analyses, mais ceci demanderait, pour des recherches étendues sur la bière, un travail assez considérable.

Il nous reste à parler de l'oxydation en fondant avec du salpêtre et de l'oxydation par l'acide nitrique et l'acide sulfurique concentrés.

Je ne me suis servi que de la dernière de ces deux méthodes. Vis-à-vis de la première, celle-ci offre le grand avantage de ne pas faire entrer de grandes quantités de substances non volatiles qui, plus tard, lors de l'évaporation de l'acide nitrique avec l'acide sulfurique, occasionneraient des soubresauts violents. De plus, l'acide nitrique du commerce se montrait toujours exempt d'arsenic. La méthode était donc à priori tout indiquée pour ces recherches.

L'application de l'acide nitrique et de l'acide sulfurique concentrés à l'oxydation de matières organiques aux recherches de l'arsenic a été proposée par M. Gautier³⁾. L'oxydation au moyen de ces acides laisse une masse carbonisée qu'on épuise par de l'eau. La solution réduite par le bisulfite de sodium est ensuite précipitée par l'hydrogène sulfuré, et le sulfure d'arsenic est transformé en acide arsénique, qu'on introduit dans l'appareil de Marsh. MM. R. H. Chittenden et H. Donaldson⁴⁾ recommandent la méthode de Gautier avec l'emploi de l'appareil de Marsh. Ils font observer que c'est la méthode qui de-

¹⁾ Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg II, 1 (1883).
Zeitschr. f. anal. Chem. XXII, 366 (1883).

²⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. XXXVIII, 344 (1899).

³⁾ Bull. Soc. chim. XXIV, 250 (1875).

⁴⁾ Ref. Zeitschr. f. anal. Chem. XXI, 478 (1882).

mande le moins de réactifs possible: du zinc, de l'acide sulfurique et de l'acide nitrique. Dernièrement la méthode, quelque peu modifiée, a été employée en Angleterre par MM. W. Thomson et J. P. Shenton¹⁾ aux recherches d'arsenic dans les bières.

Des essais faits avec de la bière de conserve, additionnée d'arsenic, d'après la méthode de MM. Thomson et Shenton, ont donné les résultats que voici:

Essais	Anneau d'arsenic
Contrôle: 45 ^{cc} HNO ³ + 5 ^{cc} H ² SO ⁴	aucun
50 ^{cc} de bière	—
50 ^{cc} - — + 1/100 ^{mg} d'arsenic	environ 1/100 ^{mg} d'arsenic
50 ^{cc} .. — + 1/20 ^{mg} —	{ moins de 1/50 ^{mg} — égal à 1/30 ^{mg} —

Ainsi l'erreur dont était entachée la méthode entre mes mains était que, dans un cas, sur 1/20^{mg} d'arsenic en 50^{cc} de bière je ne pouvais montrer que 1/30^{mg}, et que, dans un autre cas, je n'en trouvais même que moins de 1/50^{mg}. Cependant, par un examen plus approfondi on voyait que ces résultats variés étaient dus surtout à deux causes: d'abord les composés oxygénés de l'azote formés par l'oxydation au moyen de l'acide nitrique n'étaient pas toujours complètement chassés; puis, la matière organique n'était pas absolument détruite avant l'essai à l'appareil de Marsh.

Par l'oxydation au moyen de l'acide nitrique il se forme, surtout vers la fin de l'opération où le liquide contient de l'acide sulfurique bouillant presque concentré, du sulfate acide de nitrosyle $\text{SO}_2 \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{O.NO} \end{smallmatrix}$ (cristaux des chambres de plomb). En évaporant la solution jusqu'à ce qu'elle commence à émettre des vapeurs sulfuriques, tout l'acide azotique est chassé, tandis que le sulfate acide de nitrosyle reste dans la fiole, formant un liquide qui est jaune ou jaune vert à la chaleur, mais qui se décolore au froid. Quand on étend d'eau ce liquide jusqu'à la densité de 1.2 (30 p. c. de H² SO⁴), il se décompose. Évaporé jusqu'à la formation de vapeurs sulfuriques il perd tous les composés oxygénés de l'azote (A. Rose²⁾). MM. Thomson et Shenton proposent de porter le liquide à deux fois son volume en l'étendant d'eau,

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Pogg. Ann. L 161 (1840).

puis d'évaporer jusqu'à la formation de vapeurs sulfuriques. A mes essais ce procédé ne donnait pas toujours un résultat satisfaisant. Mais en répétant les dilutions et les évaporations deux ou trois fois on arrivait toujours à chasser tous les composés oxygénés de l'azote. La nécessité de cette mesure fait que l'analyse demande un temps plus long. Aussi fut-ce un perfectionnement essentiel de la méthode que l'application du procédé de Pélouze¹⁾ pour l'élimination des composés oxygénés de l'azote de l'acide sulfurique. Suivant ce procédé on chauffe à 160° avec du sulfate d'ammonium. En remplaçant les évaporations répétées par ce procédé on obtenait d'excellents résultats. Sous l'influence des composés oxygénés de l'azote et de l'acide azotique le sulfate d'ammonium y donne de l'azote et de l'eau. C'est cette réaction, on sait, qui empêche l'application de la méthode du dosage de l'azote de Kjeldahl²⁾ aux composés contenant de l'acide azotique ou du bioxyde d'azote, avant qu'on ait traité ces composés par un corps réducteur.

Plusieurs essais ont montré qu'il est nécessaire qu'après la décomposition du sulfate acide de nitrosyle et sa dilution d'eau le liquide soit absolument incolore, en d'autres mots: que toute matière organique soit détruite. En effet, si la solution est tant soit peu jaunâtre, l'anneau d'arsenic diminue toujours sensiblement. Cependant, comme le plus souvent après l'oxydation au moyen de l'acide nitrique le liquide chaud était d'une teinte jaune due au sulfate acide de nitrosyle qu'il contenait, j'ai préféré d'ajouter au liquide chaud encore quelque 2^{cc} d'acide nitrique concentré pour m'assurer de la destruction complète de toute matière organique, ce qui a fait diminuer sensiblement la teinte jaune s'il y restait encore de la matière organique. En évaporant et en traitant après avec du sulfate d'ammonium j'ai toujours obtenu un liquide absolument incolore³⁾.

¹⁾ Ann. chem. phys. [3]. II, 47 (1841).

²⁾ Loc. cit.

³⁾ Après que j'eus écrit ceci, on a donné, à la Chemiker Zeitung n° 47, 1902, le compte-rendu d'une séance tenue à Leeds le 26 mai 1902 par la Society of Chemical Industry, section d'Yorkshire. à laquelle M. A. J. Murphy a attiré l'attention sur le même fait: la nécessité de la destruction complète, par oxydation, des matières organiques, avant le dosage à l'appareil de Marsh, pour arriver à des résultats s'accordant entre eux et qu'autrement on n'obtiendra pas. Au même endroit M. W. Ackroyd déconseille l'emploi d'anneaux d'arsenic comme „standards“ croyant avoir remarqué qu'ils se présentent avec des couleurs variées d'après la vivacité du dégagement d'hydrogène. D'après ce que je viens de dire plus haut, cette objection n'est bien fondée qu'au cas où on néglige les précautions déjà indiquées en se servant de l'appareil de Marsh. Si on les observe, le dégagement d'hydrogène se fera toujours avec la même vivacité pour la même teneur en arsenic.

Après avoir constaté que cette méthode d'oxydation peut servir avec utilité, j'ai passé à des expériences pour reconnaître l'influence que pourra exercer la variation des manipulations.

J'ai commencé par déterminer les quantités d'acide azotique nécessaires à l'oxydation de 100^{cc} de bière selon que l'oxydation avait lieu dans une fiole de 200^{cc} ou dans une capsule de porcelaine découverte, et selon que les volumes d'acide azotique additionnés à la fois étaient plus au moins grands. En même temps on a observé le temps nécessaire aux différentes oxydations.

A toutes les expériences on commençait l'oxydation par 20^{cc} d'acide azotique et 5^{cc} d'acide sulfurique. Voici les volumes d'acide azotique supplémentaires qu'il a fallu ajouter pour obtenir l'oxydation complète :

Expériences	Acide azotique additionné	Quantité d'acide azotique employé en ^{cc}	Durée de l'oxydation en heures
Dans une fiole de 200 ^{cc}	en une fois	25	2 ¹ / ₂
— — —	par 2 ^{cc}	15	2
Dans une capsule de porcelaine..	25 + 25 + 10 + 10		
	+ 5 + 5 + 5 ^{cc}	85	2 ³ / ₄
— — — ..	par 2 ^{cc}	50	1 ¹ / ₂

On voit donc que l'oxydation dans une capsule de porcelaine demandait beaucoup plus d'acide azotique que dans une fiole, et comme la durée des expériences ne variait pas beaucoup, il faut aux dosages préférer l'oxydation dans une fiole¹⁾.

On voit encore de ces expériences que l'oxydation s'opère au moyen de quantités d'acide azotique moins grandes quand on ajoute l'acide par de petites doses de 2^{cc} que lorsqu'on l'additionne par des quantités plus grandes de 25^{cc}. Mais l'addition par de petites doses étant un travail pénible et désagréable lorsqu'il s'agit de beaucoup d'analyses simultanées, je préférais d'ajouter l'acide en grandes parties en commençant par 30^{cc} et en descendant, vers la fin de l'oxydation, à des quantités de 10 à 2^{cc}.

Avant l'oxydation il fallait évaporer les 100^{cc} de bière de chaque expérience. Des expériences ont montré que l'oxydation s'opère le plus tranquillement si on évapore à la moitié du volume. Rien n'em-

¹⁾ Quoique tout verre contienne de l'arsenic, il ne m'était jamais possible d'en constater l'introduction dans l'analyse en employant des fioles d'Iéna à l'oxydation au moyen de l'acide azotique.

pêche de faire évaporer dans une capsule de porcelaine, mais en se servant de la fiole dans laquelle l'oxydation aura lieu plus tard, on économisera naturellement du travail. L'inconvénient en est, cependant, qu'avant l'ébullition de la bière il se forme une forte écume qui souvent sort du col en débordant et qu'il n'est pas facile de réprimer.

On prévient cette formation d'écume par l'addition d'acide tannique ou, mieux encore, d'acide azotique: 15 à 20 gouttes d'acide azotique concentré par 100^{cc} de bière donnaient le meilleur résultat. Par l'addition de cette quantité la bière entre en ébullition sans la moindre formation d'écume, s'évaporant par l'ébullition dans les fioles obliquement posées aussi vite qu'en capsule de porcelaine. Quand on ajoute une quantité plus forte d'acide azotique, 5^{cc} par exemple, la bière entre en ébullition sans formation d'écume, mais, évaporée à la moitié environ de son volume, elle a souvent une tendance à faire explosion en lançant tout le contenu par le col. Au contraire, une quantité moins grande que 15 gouttes d'acide azotique ne suffit pas toujours à prévenir la formation de l'écume.

Après l'addition de 15 à 20 gouttes d'acide azotique la bière est évaporée au volume de 60—50^{cc}. Si on mène plus loin l'évaporation, l'oxydation commencera souvent, après qu'on aura ajouté de l'acide azotique et de l'acide sulfurique, avec une violence tellement grande que le refroidissement instantané de la fiole sera nécessaire pour empêcher le débordement du contenu.

Après quelques essais d'orientation j'ai préféré d'employer pour l'oxydation même 30^{cc} d'acide azotique concentré et 10^{cc} d'acide sulfurique concentré. Quand on emploie moins de 30^{cc} d'acide azotique — soit, par exemple, 10^{cc} —, l'oxydation ne se passe pas sans agitation.

Voici les résultats de recherches faites d'après la méthode de l'acide azotique sous cette forme:

Essais	Anneau d'arsenic
Contrôle: 45 ^{cc} HNO ³ + 10 ^{cc} H ² SO ⁴ + (NH ⁴) ² SO ⁴ ..	aucun
100 ^{cc} de bière de conserve	—
100 ^{cc} - - - + 1/100 mg d'arsenic.....	= 1/100 mg d'arsenic
100 ^{cc} - - - + 1/20 mg -	≤ 1/20 mg —
100 ^{cc} - - - + 1/10 mg -	≤ 1/10 mg —
100 ^{cc} - - - + 1/5 mg -	≤ 1/5 mg —

Comme, dans ces essais, l'arsenic, après l'oxydation au moyen de l'acide azotique, se présente sous la forme d'acide arsénique, j'ajouterai que des essais directs ont montré que l'arsenic sous cette forme donne

exactement le même anneau que la même quantité d'arsenic sous la forme d'acide arsénieux. •

Ainsi donc, quand même les anneaux d'arsenic, obtenus par cette forme de la méthode de l'acide azotique, n'étaient pas tout aussi grands que ceux de l'échelle normale, ils en étaient assez près pour exclure tout jugement erroné, qu'il s'agisse de petites ou de plus grandes quantités d'arsenic. Comme d'ailleurs ce procédé dépasse en exactitude toutes les autres méthodes essayées par moi, ce fut elle que nous avons choisie pour la recherche définitive d'arsenic dans les bières danoises (Résultats v. p. 131).

Voici, en résumé, la manière de procéder en se servant de la méthode de l'acide azotique:

On débarrasse la bière de l'excès d'acide carbonique en agitant dans un grand flacon à large ouverture bouché à l'éméri. On la verse sur un filtre plissé qui retient l'écume formée par l'agitation. Pour chaque dosage on enlève avec une pipette 100^{cc} de bière, qu'on met dans une fiole d'Iéna de 200^{cc} de capacité; puis on ajoute 15 gouttes d'acide azotique concentré. La fiole est inclinée sur un bec d'Argand (pourvu d'une cheminée de terre), comme pour les dosages d'azote de Kjeldahl. On évapore pendant une heure jusqu'à 60^{cc}. Après le refroidissement, la bière est prête à être oxydée. On ajoute 30^{cc} d'acide azotique concentré et 10^{cc} d'acide sulfurique concentré. En laissant reposer, l'oxydation commencera toute seule au bout de quelque temps; cependant, on fera bien de l'accélérer en chauffant doucement et avec précaution. A l'ordinaire, l'oxydation commence d'un coup et avec violence, accompagnée de vapeurs nitreuses. Aussi faut-il éteindre la flamme aussitôt après la production de cette réaction. On rallume le bec au bout de quinze minutes. Après quelque temps d'ébullition le contenu de la fiole commence à s'assombrir. On ajoute encore 30^{cc} d'acide azotique. On continue d'additionner ainsi des quantités convenables d'acide azotique jusqu'à ce que le liquide cesse de se brunir quand on évapore jusqu'à l'apparition de vapeurs sulfuriques. Ainsi que nous avons dit plus haut, on ajoute encore, pour plus de sûreté, quelques centimètres cubes d'acide azotique et, au bout d'un quart d'heure, trois ou quatre spatules — environ 0.^{gr}5 en tout — de sulfate d'ammonium solide. Après trois quarts d'heure d'ébullition l'opération est finie: la solution est prête à être essayée à l'appareil de Marsh. La sensibilité est de 1 : 10,000,000, c'est à dire: on pourra constater la présence de 1/100^{mg} d'arsenic en 100^{cc} de bière¹⁾.

¹⁾ Voici, au contraire, la méthode des recherches d'arsenic dans les bières recommandée par The Conjoint Committee: dans un creuset de

Denigès¹⁾ propose d'employer à l'oxydation des matières organiques de l'acide azotique et une solution contenant 2 p. c. de permanganate de potassium. Cependant, un essai, fait ainsi, ne paraissait présenter aucun avantage ni pour l'économie de la durée de l'opération ni pour l'économie de l'acide.

Voici un autre essai de l'emploi d'acide azotique et de permanganate de potassium: comme à l'ordinaire la bière évaporée est oxydée au moyen de 30^{cc} d'acide azotique et de 10^{cc} d'acide sulfurique jusqu'à la coloration sombre. On achève l'oxydation en ajoutant du permanganate de potassium solide, puis on décolore au moyen d'acide oxalique (2^{gr}). L'oxydation faite ainsi demande beaucoup moins de temps que si on emploie l'acide azotique seul, et on n'emploie que 6^{gr} de permanganate de potassium contre 24^{gr} que demande la méthode de M. H. Reddelien. Mais à l'évaporation jusqu'à la production de vapeurs sulfuriques pour chasser l'acide azotique il s'est produit des soubresauts tellement violents par suite des sulfates que contient le liquide, qu'il a fallu cesser l'opération.

4. Méthode de précipitation d'après Reinsch.

Nous avons dit que cette méthode a été élaborée surtout en Angleterre pour servir aux recherches des bières par MM. A. Chapman, Alf. H. Allen, E. Jones, The Commission to the Manchester Brewers' Central Association²⁾. Tous ils font bouillir la bière avec du cuivre poli. Ils caractérisent le dépôt de cuivre soit en chauffant le cuivre dans un tube étroit fermé d'un bout (Chapman, Allen, Commission), soit en faisant dissoudre le dépôt d'arsenic pour le doser en précipitant par l'hydrogène sulfuré et en pesant (E. Jones).

De ces méthodes, la première n'est qu'une épreuve qualitative d'arsenic. On en indique la sensibilité à 1 : 2,000,000 soit $\frac{1}{10}$ mg d'arsenic en 200^{cc}. En faisant un essai avec cette quantité j'ai obtenu un dépôt distinct noir, dont j'ai essayé la caractérisation en sublimant dans un tube étroit suivant les indications de la Commission

porcelaine on chauffe 10^{gr} de la matière sur un bain de sable avec 10—15^{cc} d'acide azotique jusqu'à la cessation des vapeurs rutilantes d'acide hypoazotique. On ajoute 3^{cc} d'acide sulfurique concentré en chauffant jusqu'au commencement de la carbonisation. Cela fait, on additionne encore 5^{cc} d'acide azotique. On continue de chauffer pour chasser tout l'acide. On épuise le résidu noir et carbonisé avec de l'acide chlorhydrique étendu, et lave à l'eau. Le filtré, qui doit être parfaitement incolore, est évaporé à 30^{cc} et examiné à l'appareil de Marsh.

¹⁾ Ref. Chem. Centr. Blatt, LXXII, 2. P. 956 (1901).

²⁾ Loc. cit.

sans réussir à obtenir un sublimé de cristaux d'anhydride arsénieux reconnaissable sous le microscope.

Au contraire, le procédé de Reinsch a été employé par M. E. Jones¹⁾ pour doser l'arsenic dans la bière. Il fait bouillir celle-ci avec de l'acide chlorhydrique et deux rouleaux, l'un après l'autre, de toile métallique de cuivre, en maintenant l'ébullition avec un rouleau pendant une heure et après avec l'autre pendant une demi-heure. On dissout le dépôt d'arsenic en traitant les rouleaux de cuivre avec 5^{cc} d'une solution normale d'hydrate de sodium et 3—4 gouttes d'une solution contenant 10 p. c. de bioxyde d'hydrogène. L'arsenic est précipité de la solution au moyen d'hydrogène sulfuré et pesé sous la forme de trisulfure d'arsenic.

Cependant, ce serait un grand avantage si, au lieu de doser l'arsenic sous la forme de trisulfure d'arsenic et de peser ce dernier, on pouvait doser la solution du dépôt d'arsenic dans la solution alcaline de bioxyde d'hydrogène directement à l'appareil de Marsh. On a fait quelques essais dans ce but. Il s'en suivait que cela pourrait se faire avec un résultat assez satisfaisant si la solution à examiner était exempte de matière organique, mais pas autrement.

1) En effet, si pendant une heure on faisait bouillir avec 25^{cc} d'acide chlorhydrique concentré et un rouleau de cuivre 200^{cc} de bière, évaporée à la moitié de son volume, + $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic, la solution d'un ton brun noir, obtenue en traitant le rouleau de cuivre avec une solution d'hydrate de sodium et de bioxyde d'hydrogène, ne donnait, à l'essai direct à l'appareil de Marsh, qu'un anneau d'arsenic égal à environ $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic.

2) Si, au contraire, on faisait bouillir avec de l'acide chlorhydrique et un rouleau de cuivre 100^{cc} d'eau + $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic on obtenait, après le traitement avec l'hydrate de sodium et le bioxyde d'hydrogène, un liquide limpide comme de l'eau et qui donnait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{30}$ mg d'arsenic.

3) De même, 100^{cc} d'eau bouillant, sans addition d'arsenic, pendant une heure avec 25^{cc} d'acide chlorhydrique et un rouleau de cuivre, donnaient, après le traitement avec l'hydrate de sodium et le bioxyde d'hydrogène, une solution qui, essayée à l'appareil de Marsh, donnait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{100}$ mg d'arsenic.

4) En dosant l'arsenic de 50^{cc} d'acide chlorhydrique, en l'évaporant avec de l'eau (50^{cc}) et de l'acide azotique (20^{cc}) et de l'acide sulfurique (10^{cc}) jusqu'à l'émission de vapeurs sulfuriques, puis faisant bouillir avec du sulfate d'ammonium, on obtenait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{100}$ mg

¹⁾ Loc. cit.

d'arsenic. Donc 25^{cc} d'acide chlorhydrique contenaient $\frac{1}{200}$ mg d'arsenic. Il s'ensuit que la moitié du contenu d'arsenic de 3) provient du rouleau de cuivre et de l'hydrate de sodium et du bioxyde d'hydrogène. Ce résultat s'accorde avec le fait

5) qu'en traitant le rouleau de cuivre de la manière indiquée avec une solution alcaline de bioxyde d'hydrogène on obtenait un anneau égal à $\frac{1}{200}$ mg d'arsenic.

Pour essayer si, dans l'essai 1), la précipitation était complète ou non, on a oxydé la solution brune noire jusqu'au point où elle était limpide comme de l'eau. En effet, il était naturel de supposer que c'étaient les matières organiques de la solution colorée qui avaient empêché le dosage de l'arsenic dans l'appareil de Marsh. Il était facile d'obtenir l'oxydation et la décoloration de la solution brune noire en additionnant à la solution chaude du permanganate de potassium solide et de l'acide sulfurique et en décolorant avec des cristaux d'acide oxalique. On obtenait ainsi un liquide absolument limpide comme de l'eau. A l'essai de l'appareil de Marsh il donnait un anneau d'arsenic égal à $\frac{1}{30}$ mg d'arsenic si on avait mis à l'essai 200^{cc} de bière additionnée de $\frac{1}{20}$ mg d'arsenic.

Le tableau suivant donne les résultats d'essais, faits de cette manière, de bières contenant une quantité connue d'anhydride arsénieux.

Essais	Anneau d'arsenic	Trouvé
Contrôle: 2 rouleaux de cuivre bouillis avec 100 ^{cc} d'eau + 25 ^{cc} d'acide chlorhydrique	$\leq \frac{1}{50}$ mg d'arsenic	—
200 ^{cc} de bière	$> \frac{1}{100}$ mg —	rien
200 ^{cc} - — + $\frac{1}{50}$ mg d'arsenic....	$= \frac{1}{30}$ mg —	$\frac{1}{50}$ mg d'arsenic
200 ^{cc} - — + $\frac{1}{10}$ mg —	$= \text{env. } \frac{1}{10}$ mg —	$\frac{1}{10}$ mg —
200 ^{cc} - — + $\frac{2}{5}$ mg —	$= - \frac{2}{5}$ mg —	$\frac{2}{5}$ mg —

D'après ceci la méthode paraissait assez satisfaisante et bien faite pour servir à des dosages de contrôle à côté de la méthode d'oxydation au moyen de l'acide azotique. Cependant, à cause de l'arsenic contenu dans l'acide chlorhydrique — l'essai de contrôle donnant $\frac{1}{50}$ mg d'arsenic — elle ne convient pas, nous venons de le dire, au dosage exact de quantités au-dessous de $\frac{1}{50}$ mg d'arsenic.

Restait encore à essayer l'indication de M. A. Allen¹⁾ suivant

¹⁾ The Analyst XXVI, 10 (1901).

laquelle l'arsenic qu'on trouve sous la forme d'acide arsénique doit être réduit à l'acide arsénieux avant la précipitation d'après Reinsch. On y arrive facilement en faisant bouillir avec une solution chlorhydratée de chlorure cuivreux. Voici les résultats obtenus en essayant de la bière avec et sans chlorure cuivreux, après qu'on l'eut additionnée d'acide arsénique et fait bouillir avec une toile métallique de cuivre poli:

Essais	Faisant bouillir	Anneau d'arsenic	Arsenic trouvé
Contrôle: 25 ^{cc} H Cl + 10 ^{cc} d'une solution contenant 10 p. c. de Cu ² Cl ²	avec du Cu ² Cl ²	1/100 mg	—
200 ^{cc} de bière + 1/50 mg As (As ² O ⁵)....	— —	1/30 mg	1/50 mg
200 ^{cc} - — + 1/50 mg —	sans —	1/30 mg	1/50 mg
200 ^{cc} - — + 2/5 mg —	avec —	2/5 mg	2/5 mg
200 ^{cc} - — + 2/5 mg —	sans —	≥ 1/5 mg	≥ 1/5 mg

Ainsi il ne faut pas laisser d'ajouter du chlorure cuivreux en présence de quantités considérables d'acide arsénique. Au contraire, pour des quantités peu importantes comme 1/50 mg on peut s'en passer.

Voici donc quel sera le procédé à suivre pour la recherche d'arsenic dans les bières d'après la méthode de Reinsch ainsi modifiée et jointe à l'appareil de Marsh.

On évapore 200^{cc} de bière jusqu'à la moitié de son volume dans une fiole inclinée de 300^{cc} de capacité. On fait bouillir pendant une heure après avoir ajouté 25^{cc} d'acide chlorhydrique concentré pur, 10^{cc} d'une solution chlorhydratée contenant 10 p. c. de chlorure cuivreux et un rouleau de toile métallique de cuivre poli (2¹/₂ × 9^{cm}). On enlève le rouleau qu'on remplace par un deuxième rouleau, avec lequel on fait bouillir pendant une demi-heure. On lave avec précaution les deux rouleaux à l'eau; puis on chauffe dans une éprouvette avec 5^{cc} d'une solution normale d'hydrate de sodium et 5 gouttes d'une solution contenant 10 p. c. de bioxyde d'hydrogène. On verse la solution du dépôt d'arsenic et l'eau de lavage des rouleaux de cuivre — en tout environ 75^{cc} — dans une fiole de 300^{cc} de capacité. On y ajoute du permanganate de potassium solide et 5^{cc} d'acide sulfurique concentré. Puis on chauffe, et on décolore au moyen de cristaux d'acide oxalique. Le liquide limpide comme de l'eau qu'il faut obtenir, sert directement au dosage à l'appareil de Marsh¹⁾.

¹⁾ On peut nettoyer les rouleaux de cuivre employés pour s'en servir à de nouveaux essais en les traitant avec de l'acide azotique dilué. L'acide

Néanmoins lorsque, plus tard, on faisait une longue série de recherches sur les bières en se servant tantôt de cette méthode, tantôt de la méthode de l'acide azotique, on constatait que la méthode de Reinsch n'était pas toujours absolument sûre: à quelques-unes des essais la précipitation de l'arsenic n'était pas complète. La cause en était-elle une petite différence à la préparation des rouleaux de cuivre ou bien une différence à la force de l'ébullition, c'est ce qui reste incertain. Mais comme l'économie de durée qu'on pourrait gagner peut-être en se servant de cette méthode plutôt que de l'oxydation au moyen de l'acide azotique n'était que peu importante, cette dernière méthode était absolument préférable à cause de sa sûreté.

5. Méthode de distillation.

Cette méthode, indiquée par MM. Schneider et Fyfe¹⁾ et modifiée plus tard par M. E. Fischer²⁾, trouve, ainsi que nous l'avons dit plus haut, une application étendue aux recherches d'arsenic. Nous avons fait les essais suivants pour en éprouver l'utilité au dosage de petites quantités d'arsenic dans les bières:

On évapore 200^{cc} de bière dans une capsule de porcelaine. On y ajoute 50^{cc} d'acide chlorhydrique et 20^{cc} d'une solution saturée de chlorure ferreux. On porte ce liquide dans un matras pour la distillation fractionnée de 500^{cc} de capacité pourvu d'un bouchon de liège. Le volume total du liquide sera ainsi de 150^{cc} à peu près. On en distille 100^{cc} qu'on évapore dans une capsule de porcelaine additionnant 20^{cc} d'acide azotique et 5^{cc} d'acide sulfurique pour chasser l'acide chlorhydrique. On évapore jusqu'à la production de vapeurs sulfuriques; puis on fait bouillir avec du sulfate d'ammonium. On porte la solution à l'appareil de Marsh pour l'y doser.

Essais	Anneau d'arsenic	Arsenic trouvé
Contrôle: 50 ^{cc} de H Cl + 20 ^{cc} de Fe Cl ² en solution	= 1/100 mg	—
200 ^{cc} de bière.....	= 1/100 mg	rien
200 ^{cc} - — + 1/50 mg d'arsenic	= 1/30 mg	1/50 mg
200 ^{cc} - — + 1/10 mg —	≥ 1/20 mg	≥ 1/20 mg
200 ^{cc} - — + 2/5 mg —	≥ 1/5 mg	≥ 1/5 mg

détache le dépôt brun produisant une surface parfaitement polie. On rince à l'eau et conserve les rouleaux dans de l'eau faiblement chlorhydratée.

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Loc. cit.

Ainsi donc, pour de petites quantités d'arsenic on retrouve tout l'arsenic additionné, tandis que pour des quantités assez considérables — $1/10$ — $2/5$ mg d'arsenic —, on ne retrouvait, par une seule distillation, que la moitié, à peu près, de la quantité d'arsenic présente. Cette méthode n'égale donc pas non plus, pour l'exactitude, la méthode d'oxydation au moyen de l'acide azotique.

Je crois avoir compris, dans ce qui précède, toutes les méthodes de dosage de petites quantités d'arsenic desquelles il peut être question dans ces recherches. En voici le résultat :

1° *L'appareil de Marsh sous la forme décrite pp. 112—116 avec l'emploi de zinc et d'acide sulfurique purs convient parfaitement au dosage de petites quantités d'arsenic, pourvu que celui-ci ne se trouve pas combiné avec des matières organiques ou des sels en quantité démesurément grande.*

2° *L'acide sulfurique concentré est le meilleur moyen de dessiccation de l'hydrogène arsénié, pourvu qu'à chaque essai on emploie la même quantité de nouvel acide sulfurique.*

3° *Le tube d'essai doit être maintenu au rouge sombre.*

4° *Des différentes méthodes essayées pour donner à l'arsenic la forme convenable à son dosage au moyen de l'appareil de Marsh la plus sûre et la plus exacte c'est l'oxydation au moyen d'acide azotique et d'acide sulfurique, exécutée de la manière décrite plus haut (p. 124) avec l'emploi du sulfate d'ammonium pour chasser les composés oxygénés de l'azote.*

Nous finirons en donnant au tableau suivant les résultats d'une série de recherches sur les bières de Copenhague à fermentation basse et à fermentation haute, ainsi que de quelques bières anglaises. La méthode de dosage employée est la méthode de l'acide azotique.

Pour chaque essai on a employé 100^{cc} de bière. A la deuxième colonne du tableau on trouvera la quantité d'acide azotique consumée à l'oxydation complète de chaque échantillon. La troisième colonne montre la grandeur de l'anneau d'arsenic directement trouvé. La dernière colonne indique la teneur en arsenic des échantillons examinés, obtenue en déduisant la teneur en arsenic de l'essai de contrôle de l'arsenic trouvé directement. Dans les cas où la quantité indiquée par l'anneau d'arsenic n'atteignait pas $1/200$ mg d'As la teneur de l'échantillon examiné a été mise égale à zéro. En effet, il est impossible d'ar-

river à un dosage sûr de quantités d'arsenic tellement petites au moyen de l'appareil de Marsh sous la forme décrite ici; puis, ainsi qu'il résulte de la troisième colonne du tableau, la méthode d'oxydation ne permet pas de constater avec exactitude des quantités au-dessous de $\frac{1}{200}$ mg d'As. Par conséquent, la sensibilité de la méthode est évaluée à $\frac{1}{100}$ mg d'As en 100 cc de bière.

Marque de la bière	Quantité d'acide azotique consommé	Anneau d'arsenic	Arsenic trouvé
	en centimètres cubes	mg. d'As	mg. d'As
Bières à fermentation basse:			
Contrôle: 10 cc de $\text{H}^2\text{SO}^4 + (\text{NH}^4)^2\text{SO}^4$	75	$< \frac{1}{200}$	aucun
Gl. Carlsberg: Imperial Stout	30 + 30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Export Beer	30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de conserve	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière de Pilsner	30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
Ny Carlsberg: Double Brown Stout....	30 + 30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Export Beer	30 + 30 + 15 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de conserve	30 + 30 + 15 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de Pilsner	30 + 30	$< \frac{1}{200}$	—
Tuborgs Fabrikker: Bière de conserve	30 + 30 + 15 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de Pilsner..	30 + 30	$< \frac{1}{200}$	—
De forenede Bryggerier: Alliance Double Brown Stout	30 + 30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
Bières à fermentation haute:			
De forenede Bryggerier: Vrai extrait de malt	30 + 30 + 30 + 15 + 15 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Vraie bière à couronne...	30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Pilsner à couronne	30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière centrale prem. qual.	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière blanche centrale no. 1	30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière de mer centrale no. 1	30 + 30 + 15	0	—
Kbh. Bryg. og Malterier: Bière à couronne	30 + 30 + 15 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Pilsner à fermentation haute	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière blanche prem. qual.	30 + 30 + 15	$< \frac{1}{200}$	—
ibid. Bière blanche no. 1	30 + 30 + 15	0	—
ibid. Bière de mer no. 1	30 + 30	$< \frac{1}{200}$	—
Bières anglaises:			
Bass & Co: Imperial Stout (B 771)....	30 + 30 + 30 + 15 + 15	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$
ibid. Pale Ale	30 + 30 + 15	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$
Guinness: Extra Stout	30 + 30 + 30 + 15	$> \frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
Whitbread & Co: Stout	30 + 30 + 30	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$

Il résulte de ces analyses que des bières de toutes les brasseries de Copenhague — qu'il s'agisse de bières à fermentation basse, de bières à fermentation haute, ou même des bières les plus riches en extrait de malt — pas une ne contenait la moindre trace d'arsenic. Au contraire, on en constatait une trace minime et sans importance dans les bières de plusieurs des brasseries anglaises les plus importantes. Ce fait tient peut-être à la construction particulière des tourailles anglaises.

Juillet 1902.

Études sur les enzymes protéolytiques de l'orge en germination (du malt)¹⁾.

Par

Fr. Weis.

I.

Introduction.

Historique de la question. Le Problème.

Lorsqu'à la demande de mon chef de laboratoire défunt, le professeur *Johan Kjeldahl*, j'ai entamé ce travail (novembre 1898) la littérature ne contenait que des indications très vagues ou absolument négatives sur l'existence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination et dans le malt. Les expériences qui avaient donné des résultats positifs à ce sujet, avaient été reproduites par d'autres savants, qui n'avaient pu les confirmer.

Mais on continuait de parler de l'enzyme comme d'une chose existante, soit qu'on eût plus de confiance dans les indications positives, soit qu'on concluât, par analogie, qu'une telle enzyme devait se trouver dans l'orge en germination. On lui avait même, d'avance, donné un nom: la *peptase*.

En effet, on avait démontré l'existence d'enzymes protéolytiques dans différentes autres plantes: la papaïne dans le latex de *Carica papaya* (Wurtz 1879, Sidney Martin 1883, et d'autres); la broméline dans le fruit d'*Ananassa sativa* (Marcano 1891, Chittenden 1894); de différentes soi-disant trypsines végétales, parmi lesquelles il faudra, d'après tout leur mode d'action, placer aussi les deux déjà nommées; on les trouve dans les graines non germées et en germination des vesces (Gorup-Besanez 1874), des lupins (Gorup-Besanez 1874, Green 1887), de *Ricinus communis* (Green 1890); dans le fruit de *Cucumis utilisissimus* (Green 1892); dans les sécrétions de plantes insectivores (*Nepenthes*, *Drosera*, *Dionæa*, *Pinguicula*) (Darwin 1872 et 1888, Hooker 1874, Lawson-Tait 1875, Vines 1877 et

¹⁾ Thèse publiée et soutenue, pour le doctorat ès sciences, à l'Université de Copenhague, le 28 Novembre 1902.

1897, et d'autres)¹⁾. — On savait que, pendant la transformation, dans les plantes, des albuminoïdes, il se produit, par des dédoublements souvent profonds, des peptones et des corps amidés (v. en particulier les études d'E. Schulze et de ses élèves) analogues à ceux qui se produisent dans l'organisme animal sous l'action du suc gastrique et du suc pancréatique. Il était donc naturel de supposer que des enzymes protéolytiques étaient généralement répandues dans le règne végétal et spécialement que, dans l'orge en germination et dans le malt, il y en avait une qui aurait de l'importance pour la germination et qui, entre autres choses, déterminerait la teneur en matières azotées du moût et de la bière.

Il est vrai qu'au courant de 1899 on nia catégoriquement l'existence de cette enzyme (v. plus loin). Mais ces dénégations n'avaient pour effet que la production d'expériences décisives en faveur des indications positives. Au courant de 1900 ces matériaux abondent.

Dans le résumé historique qu'avant de parler de mes propres expériences je vais tracer aux pages suivantes, je me bornerai, autant que possible, à la littérature sur des enzymes protéolytiques²⁾ dans les grains d'orge mûr et en germination et dans le malt, tout tentant qu'il soit de donner un aperçu de toutes nos connaissances des enzymes protéolytiques du règne végétal. Mais comme Green, dans son excellent livre déjà nommé (*The soluble ferments and fermentation*), vient d'en donner un, ce serait aussi, sans doute, superflu.

Dans leurs ouvrages de 1874 et 1875³⁾, Gorup-Besanez et H. Will ont les premiers indiqué la présence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination. Ils ont examiné de différentes semences, surtout celles de vesces, mais aussi celles de l'orge non germée et de l'orge en germination. La dernière était sous la forme de malt touraillé clair et de malt séché à l'air.

Voici comment ils en composent des préparations d'enzyme: On verse de l'alcool à 96 p. c. sur des grains finement pulvérisés, et on laisse reposer pendant 48 heures. Décantant l'alcool, on fait sécher à une chaleur douce. La poudre séchée est intimement mélangée avec de la glycérine de consistance sirupeuse. On fait agir la glycérine de 36 à 48 heures. L'extrait est coulé. Le restant est pressuré

¹⁾ Voir J. Reynolds Green: *The soluble ferments and fermentation*. Cambridge 1899, p. 195. On y trouve aussi une bibliographie détaillée.

²⁾ Aucun des auteurs qui se sont occupés de cette question ne suppose l'existence de plus d'une enzyme protéolytique (la peptase), tandis que je pense pouvoir alléguer de fortes raisons pour l'existence de deux enzymes, pour le moins.

³⁾ Gorup-Besanez et Will: *Ber. d. d. chem. Gesellsch.* VII, 1478 (1874) et VIII, 1510 (1875).

doucement. Les liquides obtenus sont réunis, coulés et versés, goutte à goutte, dans une éprouvette haute avec 8 parties d'alcool et 1 partie d'éther. On laisse le précipité formé sous l'alcool pendant 2 à 3 jours; on filtre et, pour dépurer ultérieurement, on le lave à l'alcool, et on le traite de nouveau avec de la glycérine. La plus grande partie se dissout dans la glycérine. Le restant insoluble donne toutes les réactions d'albumine. On précipite de nouveau l'enzyme de la dissolution de glycérine au moyen d'un mélange d'alcool et d'éther. Elle apparaît comme un beau précipité blanc granuleux. Elle contient de l'azote et du soufre. A l'incinération, elle laisse beaucoup de cendres. Elle est soluble dans la glycérine et dans l'eau.

On ajoute quelques gouttes de la dissolution d'enzyme à de la fibrine de sang bien lavée et gonflée d'avance dans de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. et qui se trouve dans une telle solution d'acide chlorhydrique. Au bout de quelques minutes, et déjà à la température ambiante, les contours des filaments fibrineux disparaissent. Au bout de 1 à 2 heures, la plupart en sont dissous. Une action prolongée et l'accroissement de la température à 35° — 39° ne semblent pas amener de changements ultérieurs. Les solutions filtrées donnent toutes les réactions de peptones „bien prononcées“. Mais de la fibrine gonflée, traitée avec de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. seul, ne s'était, au bout de plusieurs heures, que très peu changée, sans perdre sa consistance floconneuse et presque translucide.

A d'autres expériences ils font agir l'enzyme, dissoute dans de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c., sur des cubes de blanc d'œuf bouilli. Au bout de 24 à 48 heures d'action, à la température ambiante: „les bords étaient distinctement translucides et entamés, le liquide donnant toutes les réactions de peptones“.

En neutralisant les filtrés des expériences on obtenait parfois un faible précipité. Mais, dans la plupart des cas, on ne pouvait plus constater la présence de l'albumine inaltérée dans les solutions. Au contraire, à l'ébullition et à la neutralisation, les filtrés restaient, à l'ordinaire, parfaitement clairs ne donnant de précipité ni avec les acides minéraux, ni avec le ferrocyanure de potassium, ni avec le sulfate de cuivre, mais présentant la réaction du biuret absolument pure. La formation de leucine, de tyrosine, d'asparagine n'était pas reconnaissable, même au bout de plusieurs jours d'action de l'enzyme de la graine de vesce, laquelle autrement, parmi les objets examinés, donnait les réactions de beaucoup les plus fortes.

Ces résultats n'étaient atteints, pour l'orge, qu'avec du malt touraillé clair. On ne pouvait démontrer la présence de l'enzyme peptonisante dans l'orge non germée, ni dans le malt séché à l'air.

Depuis ces recherches, on a généralement considéré que la présence de l'enzyme protéolytique dans les graines en germination était démontrée à n'en pas douter. Dans une étude publiée au „Journal für Landwirtschaft 1881“ (Über das Vorkommen von Peptonen in den Pflanzen) E. Schulze et Barbieri partent de la supposition que l'existence des peptones, dont ils ont démontré la présence dans les différentes parties des plantes, est due à l'action d'un ferment protéolytique¹⁾.

Les expériences de Gorup et Will ont été reproduites par C. Krauch en 1879 („Beiträge zur Kenntniss der ungeformten Fermente im Pflanzenreich“)²⁾. Celui-ci, cependant, n'a pu montrer la présence de ferments peptonisants dans aucune des différentes parties des plantes, un grand nombre desquelles il a examiné. Pour l'orge, il n'a recherché que l'enzyme diastatique, mais il rapporte une étude non-imprimée de H. Will suivant laquelle la recherche de peptase dans la semence du pinier, du maïs, des fèves, des amandes, d'après la méthode de Gorup, avait donné partout un résultat négatif.

En 1882, C. Krauch a publié une seconde étude traitant, en particulier, les enzymes peptonisantes des plantes („Über peptonbildende Fermente in den Pflanzen“)³⁾. Il y prétend avoir reproduit exactement les expériences de Gorup tant pour les graines de vesce que pour le malt touraillé. Quant aux filaments fibrineux, il a bien reconnu une diminution de volume mais pas de disparition. La diminution est due, à son avis, à un rétrécissement qu'on observe aussi en mettant des filaments fibrineux gonflés dans un extrait glycérinien de feuilles et de boutons (ceux-ci, à l'avis de Krauch, n'ont pas d'action fermentative peptonisante). La réaction du biuret n'est pas due non plus à la transformation de la fibrine. En effet, si on porte la même quantité d'enzyme a) dans l'acide chlorhydrique dilué seul ou b) dans la fibrine + l'acide chlorhydrique, on aura, au bout d'un temps plus ou moins long, des filtrés qui donnent la réaction du biuret de même intensité; celle-ci, par conséquent, est due à la préparation d'enzyme même.

Cependant, Krauch ne décrit pas ses expériences en détail, et, dans son premier travail, il dit que, quant à l'action diastatique, il s'est servi de méthodes indiquées par Erlenmeyer (extrait par une solution saturée d'acide salicylique) et par Duquesnel (chauffage au bain-marie à 70°) pour ses préparations d'enzyme. Dans ce cas, il peut être sûr d'avoir détruit les enzymes protéolytiques qui, d'après mes re-

¹⁾ Plus tard, on a contesté la présence, en quantité notable, de vraies peptones dans les plantes.

²⁾ C. Krauch: Landwirtsch. Versuchst. XXIII 77—104 (1879).

³⁾ C. Krauch: Landwirtsch. Versuchst. XXVII 383 (1882).

cherches, sont extrêmement sensibles à l'acide salicylique au-delà des concentrations très faibles, et qui sont complètement détruites à 70°.

D'autre part, il faut avouer que les expériences de Gorup-Besanez ne sont pas particulièrement convaincantes: par sa méthode pour la préparation de peptase il a, sans doute, toujours beaucoup affaibli cette enzyme et souvent il l'a complètement détruite, à en juger par ses essais négatifs avec du malt séché à l'air.

La même année que Krauch communiquait ses derniers résultats négatifs (1882), J. Kjeldahl avait entamé la question comme faisant partie de la grande série de recherches projetées sur les matières azotées de la bière et du moût. D'autres travaux, et surtout sa méthode pour le dosage de l'azote, laquelle se présentait comme une étude préparatoire de ces recherches, l'ont forcé à interrompre les études de l'enzyme protéolytique du malt. Mais déjà alors il avait obtenu des résultats extrêmement importants. Avec la permission de la Direction du Laboratoire de Carlsberg et de mon chef actuel, M. S. P. L. Sørensen, je reproduis ici ce qui se trouve là-dessus dans son journal d'expériences que, dans le temps, il avait mis à ma disposition¹⁾.

Au lieu d'essayer d'obtenir l'enzyme à l'état de pureté en précipitant par un mélange d'alcool et d'éther, etc., comme l'avaient fait ses devanciers, et reconnaissant que de telles opérations prolongées ne font qu'affaiblir le pouvoir fermentatif, Kjeldahl (en tant qu'on peut voir de son journal d'expériences) s'est décidé out de suite à se servir d'extraits frais de parties végétales, comme il l'avait fait à ses recherches de diastase. Il a préparé les extraits de la manière, à peu près, rapportée p. 125 du 1^{er} volume des présents Comptes-rendus, en faisant digérer, pendant une heure, 1 partie de malt avec 3 à 4 parties d'eau, sans addition aucune. Il a, pourtant, dans différents essais, fait entrer des extraits de malt vert, de malt séché à l'air, de malt touraillé, de touraillons, dans des proportions variées de malt et d'eau: partout il a obtenu des résultats positifs, quoiqu'avec les touraillons l'effet n'ait été que faible.

¹⁾ Il était bien de Kjeldahl, avec sa grande modestie et tout son système de recherches, de ne publier jamais des travaux restés, à son avis, sans une certaine conclusion. Ses recherches sur l'enzyme protéolytique du malt étaient, pour lui, des études d'orientation. Il a donc, pendant les longues discussions publiques de cette question, retenu ses résultats, quoiqu'il n'ait pas douté de l'existence de l'enzyme, de laquelle il possédait des preuves certaines. Quand j'ai été nommé son préparateur, il m'a demandé de poursuivre le problème et de trouver, autant que possible, les lois de l'action de l'enzyme d'après des principes pareils à ceux qu'il avait suivis lui-même dans ses recherches sur la diastase et l'invertase.

Il a fait agir ses extraits sur des solutions de gluten de froment, obtenu, d'après la méthode de Ritthausen, par un lavage à la main de la farine de froment, dans un liquide acidulé de 0.2 p. c. d'acide chlorhydrique, d'acide acétique ou d'acide lactique.

Afin de poursuivre l'action d'enzyme, il a fini par choisir comme précipitant le sulfate de cuivre. Après avoir précipité, il neutralise avec de l'hydrate de sodium et du sel de Seignette (précipitant ainsi le gluten, mais non pas ses produits de dédoublement), après avoir soigneusement examiné d'avance la valeur des précipitants des matières albuminoïdes alors en usage. Il prépara le précipitant de 25^{gr} de sulfate de cuivre par litre d'eau, et la solution d'hydrate de sodium + de sel de Seignette était telle qu'on l'emploie à la liqueur de Fehling (63^{gr} d'hydrate de sodium et 173^{gr} de sel de Seignette par 500^{cc}), mais diluée dans la proportion de 1 à 10. Après la précipitation, on versa d'abord sur le filtre le liquide suspendu, puis le précipité, au moyen d'eau, enfin on remplit le filtre deux fois d'eau. Au dernier lavage le filtré se troubla un peu. On sécha le filtre avec le précipité au poids constant à la chaleur de 100°. On pesa, puis on calcina. On déduisit les cendres déterminées consistant principalement en cuivre. Une partie du gluten, se changeant sous l'influence de l'enzyme, se déroba à la précipitation par le sulfate de cuivre.

Dans les essais suivants on employait 10^{cc} d'une dissolution de gluten à 2 p. c., dans une solution aqueuse d'acide lactique à 0.4 p. c., et 10^{cc} d'extrait de malt, fait de 1 partie de malt touraillé pour trois d'eau. Les essais où on avait détruit d'avance le ferment par la chaleur sont nommés par Kjeldahl „passifs“ par opposition aux autres, nommés „actifs“. Les indications suivantes sont données d'après son journal d'expériences:

„Essais de l'influence de la température. Une heure d'action. Les liquides des expériences mêlés à froid:

	dépôt cuivrique	transformé
18° passif	185 milligrammes	0 milligrammes
18° actif	174 —	11 —
40° —	102 —	83 —
50° —	71 —	114 —
60° —	88 —	97 —
60° passif	184 —	1 —

Il s'ensuit de l'accord entre les essais passifs faits à 18° et à 60° que l'augmentation de température seule n'exerce aucune influence sensible.

		dépôt cuivrique	transformé
49°	actif.....	57 milligrammes	114 milligrammes
59°	—	78 } 78 —	93 —
—	—	79 }	
64 ¹ / ₂ °	—	112 } 114 —	57 —
—	—	117 }	
passif.....		171 —	0 —

Solution de gluten et extrait de malt chauffés d'avance à la température d'expérience. Une heure d'action:

		dépôt cuivrique	transformé
44°	actif.....	115 milligrammes	68 milligrammes
50 ¹ / ₂ °	—	96 } 96 —	87 —
—	—	96 }	
55°	—	98 } 101 —	82 —
—	—	104 }	
60°	—	124 } 127 —	56 —
—	—	130 }	
65°	—	161 } 162 —	21 —
—	—	162 }	
70°	—	172 —	11 —
—	passif.....	182 } 183 —	0 —
—	—	184 }	

Donc l'optimum entre 50¹/₂° et 55°.

Essais sur l'influence du temps. Chauffage d'avance¹⁾.

		dépôt cuivrique	transformé
passif		177 milligrammes	0 milligrammes
5 min.....		161 } 165 —	12 —
—		168 }	
10 min.....		151 } 153 —	24 —
—		155 }	
20 min.....		131 } 133 —	44 —
—		136 }	
30 min.....		121 —	56 —
1 heure.....		112 —	65 —
3 heures		74 —	103 —
6 —		50 —	127 —

¹⁾ Ici pas plus qu'aux séries d'essais suivantes, le journal ne donne pas d'indications de la température. Celle-ci a, sans aucun doute, été dans le voisinage de l'optimum trouvé.

Essais sur l'influence de la quantité de ferment. Cinq quarts d'heure d'action.

	dépôt cuivrique	
10 ^{cc} de solution de gluten + 10 ^{cc} d'extrait de malt, passif	166	} 168 milligr.
— — — — —	171	
10 ^{cc} de solution de gluten.....	146	} 147 —
— — — — —	147	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 2 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc} ¹⁾	123	} 131 ? —
— — — — —	140	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 4 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	121	} 122 —
— — — — —	122	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 6 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	100	} 100 —
— — — — —	100	
10 ^{cc} de sol. de gluten + 8 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	87	87 —
10 ^{cc} de sol. de gluten + 10 ^{cc} d'extrait de malt = 20 ^{cc}	62	62 —

10^{cc} d'extrait de malt donnant $168 \div 147 = 21^{\text{mg}}$ de précipité cuivrique 2^{cc}; 4^{cc}, 6^{cc}, 8^{cc} donneront 4^{mg}, 8^{mg}, 13^{mg}, 17^{mg} respectivement. L'effet de 2^{cc}, 4^{cc}, 6^{cc}, 8^{cc}, 10^{cc} d'extrait de malt est donc une diminution de $151 \div 131 = 20$, $155 \div 122 = 33$, $160 \div 100 = 60$, $164 \div 87 = 77$, $168 \div 62 = 106$. 10^{mg} par centimètre cube donneront pour

2 ^{cc}	20	(20) ^{mg}
4 ^{cc}	40	(33) ^{mg}
6 ^{cc}	60	(60) ^{mg}
8 ^{cc}	80	(77) ^{mg}
10 ^{cc}	100	(106) ^{mg}

A l'exception des 4^{cc} la proportionnalité est assez bonne

Comparaison avec la pepsine. 1^{gr} de pepsine dissous dans 200^{cc} d'acide chlorhydrique à 3 millièmes:

	dépôt cuivrique	
10 ^{cc} de sol. de pepsine + 10 ^{cc} de sol. de gluten, passif. . . (ne filtre pas)		
— — — — — après 1 heure à 40°	54	} 54 ^{mg}
— — — — — — — — —	54	
— — — — — — — — — à 50°	43	} 43 ^{mg}
— — — — — — — — — — —	44	

¹⁾ On portait toujours le volume à 20^{cc} par l'addition d'eau.

10 ^{cc} d'extrait de malt + 10 ^{cc} de sol. de gluten, après 1 heure, à 40°	125	}	126 ^{mg}
— — — — — — — — —	127		
— — — — — — — — —	à 50° 82	}	84 ^{mg}
— — — — — — — — —	85		
— — — — — — — — —	passif		175 ^{mg}
— lavage répété (5 fois)			171 ^{mg}
— sans neutralisation complète			175 ^{mg}

Ainsi l'action de la pepsine est aussi plus forte à 50° qu'à 40°.

Un lavage répété ne produit qu'une diminution peu importante du poids. La neutralisation incomplète n'en produit point.“ —

Par ces expériences Kjeldahl a parfaitement démontré l'existence, dans le malt, d'une enzyme protéolytique, et déjà il a tracé d'importantes lignes fondamentales de sa dépendance d'agents extérieurs. Si on avait publié ces résultats, on aurait pu s'épargner un grand travail fait plus tard pour fournir des preuves contre son existence.

En 1887, nous venons de le dire, J. Reynolds Green a démontré, d'une manière incontestable, la présence d'une enzyme protéolytique dans les graines et dans les plantules de *Lupinus hirsutus*¹⁾ et, plus tard (1890 et 1892), dans *Ricinus communis*²⁾ et *Cucumis utilisissimus*³⁾. Je n'aurais pas parlé ici de ces recherches, si elles n'avaient pas, par leur méthode, exercé une influence décisive sur d'autres travaux ayant pour objet l'orge en germination. Après avoir délivré, au moyen de la dialyse, un extrait végétal des matières diffusibles, entre autres de celles (peptones) qui donnent la réaction du biuret, Green constate une nouvelle formation de peptone et la production de composés cristallins: la leucine et la tyrosine, si on ajoute à l'extrait en question de la fibrine et de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c. On a donc la preuve que les graines en germination, aussi bien que les graines non germées, peuvent contenir des enzymes protéolytiques d'un caractère plutôt tryptique. Rien ne s'oppose donc à priori à la supposition qu'il pourrait en être de même de l'orge en germination.

Les travaux de Green ont d'autant plus d'importance qu'ils ne s'appuient pas exclusivement sur le fait qu'on obtient la réaction du biuret dans la partie dialysée, mais aussi sur la constatation des produits de dédoublement plus profonds de substances albuminoïdes:

¹⁾ Green: „On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. Philos. Transactions CLXXVIII B 39 (1887).

²⁾ Green: On the germination of the seeds of the Castor-oil plant. Proceed. Roy. Soc. XXXXVIII 370 (1890).

³⁾ Green: On the occurrence of vegetable trypsin in the fruit of *Cucumis utilisissimus*. Annals of Botany VI 195 (1892).

la leucine et la tyrosine tellement caractéristiques à l'action du suc pancréatique (de la trypsine). Gorup-Besanez, Krauch et d'autres, dans des recherches plus récentes, ont, sans doute, trop appuyé sur la réaction du biuret comme criterium de la protéolyse. On peut s'en servir à la fermentation pepsique, mais quand il s'agit des actions d'enzymes traitées ici et qui sont assurément d'une nature plus profonde, les substances donnant la réaction du biuret ne paraissent, surtout si l'expérience est prolongée, qu'en très petite quantité, se décomposant très vite et donnant des composés non-protéiques (bases hexoniques, amines, etc.).

C'est Rich. Neumeister¹⁾ qui a publié (1894) l'ouvrage suivant, qui traite de l'existence de l'enzyme protéolytique dans le règne végétal et qui s'occupe aussi d'orge en germination.

Il a recours à une méthode particulière pour la préparation de l'enzyme, profitant de l'observation de Wittich et de Wurtz qui ont montré que les filaments fibrineux frais extraient les enzymes protéolytiques des solutions en les absorbant ou en les condensant sur leur surface. Il broie les parties végétales (graines en germination ou plantules) avec du sable dans un mortier. Il obtient ainsi une bouillie fine „de réaction nettement acide“. Il additionne d'eau. Au bout de plusieurs heures on presse la masse à travers un linge. On porte l'extrait troublé dans un flacon laveur de Drechsel contenant des filaments fibrineux. Au moyen d'un aspirateur on fait passer, pendant deux heures, de l'air à travers le liquide de manière à en mettre toutes les parties en contact avec les filaments fibrineux. On enlève la liqueur. Les filaments sont lavés à l'eau et mis dans un flacon contenant de l'acide oxalique à 0.8 p. c. On met le flacon dans une étuve à température constante. La fibrine se dissout maintenant complètement au courant de quelques heures, tandis qu'elle se maintient presque inaltérée, même au bout de deux jours, dans des essais de contrôle simultanés, où on la laisse dans de l'acide oxalique dans des conditions identiques à une chose près: elle n'a pas été en contact d'abord avec une solution d'enzyme (extrait végétal).

Neumeister examine de cette façon des orges d'origine différente qu'il trempe dans l'eau, puis fait germer dans du sable humide ou de la sciure mouillée, jusqu'à ce que la plumule et la radicule aient atteint une longueur totale d'environ 5^{cm}. Dans ces circonstances, cependant, le pouvoir fermentatif n'est que faible, aucune peptonisation ne se laissant signaler dans la solution de fibrine, même

¹⁾ R. Neumeister: Über das Vorkommen und Bedeutung eines eiweiss-lösendes Enzyms in jugendlichen Pflanzen. Zeitschr. f. Biologie XXX 447—463 (1894).

après cinq jours d'action. D'après l'auteur, elle ne contient, pendant ce temps, en dehors d'une prépondérance de syntonines, que des albumoses primaires — ce qui aussi est un résultat.

Au contraire, en traitant de l'orge dont la plumule verte avait déjà 16—20^{cm} de long il obtient, à plusieurs reprises, des extraits très riches en ferments, la fibrine se dissolvant complètement au bout de 2 ou 3 heures et fournissant régulièrement de la peptone au bout de 48 heures. Dans un cas isolé où la plumule et la radicule avaient à peine 3^{cm} de long, il observe, déjà au bout d'une heure, la dissolution complète de la fibrine, pouvant constater, après 24 heures, une peptonisation considérable. Au contraire, il n'obtient que des résultats négatifs avec des plantules d'orge dont la plumule et la radicule n'étaient longues que de 0.5—1^{cm}, ainsi qu'avec de l'orge non germée et mouillée.

Neumeister se sert de l'acide oxalique de 0.8 p. c. au lieu de l'acide chlorhydrique qu'avaient employé ses prédécesseurs, parce qu'il croyait avoir constaté que l'enzyme n'agit, dans de l'acide chlorhydrique de 0.2 p. c., qu'au commencement, se détruisant peu à peu, tandis que l'acide oxalique de 0.4—0.8 p. c. exerce une influence beaucoup plus favorable. Il trouve dans l'action de l'acide chlorhydrique sur l'enzyme de la ressemblance avec la trypsine. Mais s'il se sert d'une solution de sel de cuisine (neutre) ou d'une solution de 0.2 p. c. de soude (alcaline), toute action s'arrête. Il en conclut: „l'enzyme n'est donc pas de nature trypsine.“

Il est donc d'avis que les plantules d'orge contiennent une enzyme protéolytique, mais seulement à la période d'une germination avancée. La raison pour laquelle Gorup-Besanez l'a trouvée au malt touraillé, mais non pas au malt séché à l'air, sera alors que celui-là a germé plus longtemps que celui-ci, sans qu'il s'en soit aperçu¹⁾.

En 1897, W. Johanssen²⁾, dans des expériences de macération, a démontré l'existence d'une enzyme protéolytique amidogène dans des grains d'orge mûrissants qu'on avait narcotisés au moyen d'une

¹⁾ Dans une étude de Fermi et Buscaglioni: Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreich, Centralbl. f. Bakteriologie. II. Abt. V 24, 63, 91, 125, 145 (1899), étude dans laquelle il ne s'agit pas autrement d'orge, il est dit (sans référence à une étude déterminée) que Mroczkowski (probablement une des premières années après 1890) a extrait de l'orge en germination une enzyme décomposant la fibrine autant à réaction neutre qu'à réaction alcaline, agissant le mieux, cependant, en la présence de l'acide chlorhydrique à 0.2 p. c.

²⁾ W. Johanssen: Studier over Planternes periodiske Livsytringer I. Det danske Videnskabernes Selskabs Skrifter [6] mathem.-naturv. Afd. VIII (5) 275—394, Copenhague (1897).

dose pas trop faible de narcotique (éther, chloroforme). — Si donc le pouvoir fermentatif protéolytique se trouve dans le grain d'orge pas mûr, il faut s'attendre à priori à le trouver aussi dans le grain en germination, quand même, dans le grain complètement mûr, il peut être affaibli au point à être difficilement observable.

Voilà, à ma connaissance, toutes les recherches qu'on avait publiées sur la question lorsque j'ai entamé mes travaux, et les recherches qui ont eu de l'influence sur le plan et la marche de ces travaux. Après les recherches de Kjeldahl je pouvais, cela va sans dire, négliger les indications négatives. Je ne me suis pas beaucoup occupé des méthodes de mes prédécesseurs si ce n'est de celle de Kjeldahl, celui-ci ayant montré une voie particulièrement féconde pour poursuivre l'action de l'enzyme et pour en élucider la nature.

Depuis 1899 on a publié sur la question un assez grand nombre de travaux auxquels je ne m'arrêterai pas longtemps, partie parce qu'ils sont restés sans influence sur ma méthode, partie parce que je trouve plus pratique de renvoyer la comparaison de mes résultats avec ceux des autres à la partie spéciale du présent travail.

Boleslaw de Verbno Laszcynski (Ueber das Vorkommen eines peptonisierenden Enzyms (Peptase) im Malz und Versuche zur Trennung der stickstoffhaltigen Bestandteile im Malz, Würze und Bier)¹⁾ arrive aux résultats que voici: „1° Il n'y a pas moyen de démontrer l'existence d'une enzyme peptonisante au malt. 2° Il n'y a pas des quantités perceptibles de peptones au malt, au moût, à la bière. 3° La solubilité des matières azotées du malt dépend des conditions d'extraction“. Entre autres choses, il a repris les expériences de Neumeister décrites plus haut, auxquelles on laisse agir l'enzyme sur la fibrine dans une solution à 0.8 p. c. d'acide oxalique après l'avoir extraite d'un extrait de malt au moyen des filaments fibrineux mêmes. Des essais avec des plantules d'orge vertes, longues de 6—9^{cm} ne donnaient pas la réaction du biuret, même au bout de 6 heures à 40°. Des essais avec du malt séché à l'air donnaient la réaction du biuret, mais, pas plus que pour des essais avec du malt touraillé foncé, il n'y avait de dissolution de fibrine, tandis qu'un essai parallèle avec de la pepsine produisit, presque tout de suite, une dissolution complète. Enfin, dans un essai, auquel, d'après Grützner²⁾, on colora de carmine la fibrine en la digérant après avec 10^{gr} de malt pendant deux heures, il obtint un filtré incolore et dans lequel l'azote ne s'était augmenté que de 24.53 à 25.21 = 0^{mg}.7. — De plus, il a fait des expériences de

¹⁾ Laszcynski: Zeitschr. für das ges. Brauwesen 22 Jahrg. p. 71, 85, 123, 140 (1899).

²⁾ Grützner: Archiv f. Physiologie VIII, 452 (1874).

brassage de durées différentes avec du malt touraillé clair à des températures variées dosant, après l'extraction, dans de différents essais, l'azote total, l'azote coagulable et l'azote précipité successivement par l'hydrate d'oxyde cuivrique (matières protéiques), par le sulfate de zinc (albumoses), par l'acide phosphotungstique (peptones et ammoniacque). Mais il part tout le temps de la supposition erronée que l'action de l'enzyme est la même que celle de la pepsine. Voici ce qu'il dit à la page 84: „Bedeutend erniedrigt würde der Phosphorwolframsäurestickstoff, während man doch bei einer enzymatischen Einwirkung zweifellos eine Erhöhung desselben durch Bildung von Albumosen und Peptonen hätte erwarten sollen. Die Annahme, dass die Spaltung der Proteinstoffe bereits zur Bildung von Amiden fortgeschritten sei, ist ganz unzulässig. Ein derartiger Vorgang würde die Anwesenheit eines Enzyms voraussetzen, das noch weit energischer auf die Eiweisskörper des Malzes einwirkt als Pepsin“. Ses essais n'admettent, en vérité, aucune comparaison et ne prouvent rien, à moins que ce ne soit la présence d'une enzyme formant des composés qui se dérobent à la précipitation par l'acide phosphotungstique, ce qui s'accorde avec mes propres résultats. Si, au moyen de la réaction du biuret, il n'a pu démontrer l'existence, à la bière et au moût, de peptones, si ce n'est en quantités minimales, c'est un résultat de quelque importance et qu'il faut noter.

La même année W. Loë publie une étude¹⁾ („Enthält das Malz ein peptonisierendes Enzym?“) qu'il termine par la déclaration catégorique que voici: „1° Ein eiweisslösendes Enzym im Malz existiert nicht. 2° Die im Malz vorhandenen, im Wasser löslichen Eiweisskörper werden während des Keimungsprozesses gebildet, und erscheint es wahrscheinlich, dass die Menge der in Lösung gegangenen Stoffe von der Art und Dauer der Extraction abhängig ist“. Il fonde ces propos sur des expériences dans lesquelles il prépare des extraits d'orge moulue, partie avec des extraits de malt, partie avec de l'eau. Il ne détermine que l'azote total, se servant des chiffres trouvés pour calculer la protéine(!). Il en obtient alors la même quantité, qu'il se serve d'extrait de malt ou d'eau. — Ces essais sont sans valeur aucune. J'en parle ici pour être complet seulement.

Ces deux travaux sont sans importance, c'est vrai, mais ils ont contribué à avancer la solution de la question. En effet, il y en avait qui se mettaient à l'œuvre avec d'autant plus de zèle qu'ils ne se sentaient pas convaincus par des résultats obtenus ainsi.

Lors de la publication de l'étude de Loë (au commencement d'avril 1899) j'avais à ma disposition, en dehors des anciennes expériences

¹⁾ W. Loë: Zeitschr. f. das ges. Brauwesen 22 Jahrg. 212 (1899).

de Kjeldahl, un grand nombre d'expériences nouvelles qui ne laissent aucun doute sur l'existence d'une enzyme protéolytique dans le malt. J'avais décidé de n'en rien publier avant d'avoir donné à mon travail une certaine conclusion. Cependant, un assez grand nombre d'études¹⁾, auxquelles je reviendrai plus loin, ayant paru au courant de l'été 1900, je me vis forcé de donner une communication provisoire de quelques-unes de mes expériences (Über das proteolytische und ein eiweisscoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz)) à la Zeitschr. für physiol. Chemie XXXI, 79—97, communication remise le 20 septembre 1900.

Windisch et Schellhorn démontrent l'existence de l'enzyme protéolytique en faisant agir de l'extrait de malt sur la gélatine d'après Fermi²⁾. Ils constatent que la gélatine liquide ne se coagule plus, ou que la gélatine coagulée redevient liquide, si l'extrait de malt y agit pendant un certain temps, à une température convenable et, de préférence, à réaction alcaline. D'autres essais d'auto-digestion d'extraits de malt, au contraire, donnent de meilleurs résultats en présence d'un peu d'acide, de préférence organique. Ils trouvent l'enzyme tant dans le malt touraillé que dans le malt vert et, dans des cas isolés, dans l'orge non germée, surtout si celle-ci est mal récoltée ou particulièrement riche en albumine. Ils suivent l'action de l'enzyme en la faisant agir dans un liquide contenant du thymol ou du chloroforme et en déterminant, avant et après les expériences, soit la diminution de matières albuminoïdes coagulables (en faisant bouillir), soit l'augmentation d'albumoses (en précipitant par du sulfate de zinc). En quelques cas ils déterminent les peptones (en précipitant le filtré des albumoses avec de l'acide phosphotungstique) ou le soi-disant azote amidé (en faisant bouillir les filtrés des matières albuminoïdes avec de l'acide chlorhydrique pendant une heure et en distillant l'ammoniaque formée en ajoutant de l'hydrate de sodium). — Je reviendrai plus loin en détail sur les résultats de ces expériences.

Fernbach et Hubert montrent l'existence de l'enzyme de la même manière, partie par le pouvoir qu'ont les extraits de malt de liquéfier la gélatine, partie par les changements qu'en subissent

¹⁾ Windisch und Schellhorn: Ueber das eiweisspaltende Enzym der gekeimten Gerste, Wochenschrift für Brauerei XVII 334 ss. (1900).

Fernbach et Hubert: Sur la diastase protéolytique du malt. Compt. rend. CXXX 1883—85 (23 juin 1900).

Fernbach et Hubert: De l'influence des phosphates et de quelques autres matières minérales sur la diastase protéolytique du malt. C. r. CXXXI 293 (23 Juillet 1900).

Petit et Labourasse: Sur la solubilisation des matières azotées du malt. C. r. CXXXI 349 (30 Septembre 1900).

²⁾ Cl. Fermi: Centralbl. für Bakteriologie II Abt. V 25—27 (1899).

les matières azotées, exposées à l'auto-digestion. (Ils stérilisent leurs extraits de malt en filtrant à travers des bougies Chamberland). Ils font observer que, surtout à des températures basses (40° environ), le dédoublement de la molécule albuminoïde va bien au-delà de ce qu'à l'ordinaire on appelle „peptones“, un grand nombre des composés azotés se dérobant, peu à peu, à la précipitation par l'acide phosphotungstique. — Ils nous présentent aussi d'intéressantes recherches sur l'influence exercée sur l'action de l'enzyme par les phosphates et par d'autres sels et acides minéraux. Enfin, en précipitant avec de l'alcool, ils obtiennent une substance qui est à même de transformer les matières albuminoïdes coagulables des extraits de malt soumis à l'ébullition et les matières albuminoïdes insolubles que contient l'orge.

Petit et Labourasse ont fait des expériences d'auto-digestion semblables à celles de Windisch et Schellhorn, puis, ils ont dosé l'azote de protéine, la quantité d'azote précipitable par le sulfate de zinc et par l'acide phosphotungstique, enfin celle qui, sous la forme d'ammoniaque, se laisse distiller au moyen de l'hydrate de soude après l'action de l'acide chlorhydrique dilué bouillant. Ils arrivent à des résultats pareils à ceux de leurs contemporains. Ils pensent, en outre, avoir démontré la formation d'arginine.

Dans la petite étude que j'ai publiée, j'ai communiqué des résultats concernant l'influence sur l'enzyme de la température et de quelques matières étrangères (antiseptiques, acides), ainsi que quelques essais de brassage et les changements, pendant le brassage, des matières azotées précipitables par l'acide tannique. J'ai aussi démontré l'existence d'une enzyme coagulante (présure) qu'on rencontre dans les extraits de malt conjointement avec l'enzyme protéolytique.

Enfin, j'ai encore à nommer deux études: R. Wahl a publié des recherches (à la *American Brewers' Review* 1900), que je ne connais que par des comptes-rendus¹⁾. Elles ont pour but de suivre les changements des matières albuminoïdes pendant le brassage, lesquels, à l'avis de l'auteur, sont dus à l'action de la peptase. Ehrich, dans son étude²⁾, conclut à l'existence de la peptase par suite d'expériences de brassage qu'il a faites autrefois.

On voit que, depuis ces dernières années, la question est dans l'air, et puisque l'existence de l'enzyme vient d'être affirmée de tant de côtés et que des méthodes différentes ont conduit aux mêmes résultats, il faut considérer qu'on a bien constaté cette existence. Les travaux déjà

¹⁾ Entre autres au manuel de Wahl and Henius: *American Handy-book of the Brewing, Malting and Auxiliary Trades*, pp. 424—433, 707—708. Chicago (1901).

²⁾ Ehrich: *Allg. Brauer- und Hopfenzeitung*. 1. März 1901.

nommés de Green ainsi que d'autres, plus nouveaux, de Butkewitsch¹⁾, sur les enzymes protéolytiques d'autres plantes et surtout des légumineuses, viennent confirmer la supposition que ces enzymes sont aussi répandues au règne végétal qu'au règne animal.

Problème.

M'appuyant surtout sur les expériences de Kjeldahl et partant de la supposition de l'existence d'une enzyme protéolytique dans l'orge en germination et dans le malt, je me suis donné la tâche que voici:

1° apporter des preuves ultérieures de l'existence de cette enzyme;

2° examiner quantitativement la dépendance de la protéolyse de différents agents, surtout de facteurs extérieurs;

3° procurer des renseignements sur la nature et sur l'action de l'enzyme (ou des enzymes²⁾), de manière à rendre possible la détermination de sa (ou leur) place systématique parmi les enzymes congénères connues aujourd'hui.

Dans la partie traitant les lois déterminant la dépendance d'agents extérieurs de la protéolyse on trouvera des preuves irrécusables de la supposition que c'est dans les enzymes qu'il faut chercher la cause de ce phénomène. Pendant la marche de mon travail de telles preuves ont été données aussi par d'autres recherches, par celles de Windisch et Schellhorn, de Fernbach et Hubert, de Petit et Labourasse.

Cependant, c'est de l'autre côté de la question que j'ai fait ma tâche principale: mon but essentiel est d'apporter des données de la marche de la protéolyse pareilles à celles qu'a fournies Kjeldahl pour la saccharification sous l'influence de la diastase et de l'invertase.

Pendant ce travail, un grand nombre d'autres questions, qui y sont intimement liées et dont la solution contribuerait à l'élucidation du caractère de la protéolyse, se sont présentées. Ce sont les questions qui concernent la nature, l'action, l'origine, le sort de l'enzyme (des enzymes) pendant la germination et, à la malterie, pendant la torréfaction, etc.

Pourtant, j'ai avant tout, dans ce travail, eu en vue les questions purement théoriques et qui pussent être d'importance pour l'étude des enzymes en général, sans perdre de vue l'importance pratique de ce genre de recherches, en particulier pour la technique du brassage. J'ai

¹⁾ Butkewitsch: Berichte d. d. botan. Gesellsch. XXIII 358—364 (1900) et Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXII 1—53 (1901).

²⁾ Mes essais ayant démontré l'existence de plus d'une enzyme protéolytique.

déjà publié des expériences qui intéressent celle-ci dans la communication qui a paru à la „Zeitschrift für physiologische Chemie“ (XXXI, p. 79, 1900). Je me réserve de revenir sur ces expériences et sur d'autres plus nouvelles, qui tournent particulièrement sur la protéolyse pendant le brassage, dans une publication postérieure.

II.

Méthodes expérimentales.

Mes premiers essais d'orientation ont été faits, à peu près, d'après la méthode dont se servait Kjeldahl (v. p. 137). Cependant, au lieu du malt touraillé, j'employais du malt vert écrasé (une partie pour deux d'eau) pour les extraits contenant les enzymes protéolytiques et que je faisais agir sur le gluten de la farine de froment. Les résultats obtenus correspondaient à ceux de Kjeldahl. Il y avait, pourtant, comme dans les essais de celui-ci, souvent, entre les déterminations parallèles, des écarts trop grands et qu'il serait désirable d'éviter.

De plus, la dissolution du gluten employé n'était pas complète. La solution n'était jamais toute limpide. En laissant reposer, un précipité (de l'amidon, peut-être aussi des composés azotés) se formait toujours. Elle coagulait sous l'action de l'enzyme coagulante déjà nommée de l'extrait de malt — enzyme qui, d'après mes recherches, faisait aussi coaguler le lait¹⁾ — ce qui, sans doute, rendait moins nombreux les points d'attaque de l'enzyme et plus faible son action.

Pour ces raisons j'essayais de changer d'albumine, prenant celle qu'on peut extraire de la farine de froment par l'alcool à 55 p. c. et que Kjeldahl a nommée „glutine“²⁾. J'en donnerai plus loin la description détaillée avec le procédé pour l'obtenir. Ici je me borne aux caractères suivants: avec les acides faibles elle donne une solution parfaitement limpide qui ne se coagule ni à l'ébullition ni sous l'influence de la présure, tandis que, d'autre part, elle est très sensible à l'action des enzymes protéolytiques de l'extrait de malt.

Alors une nouvelle difficulté s'est produite. Avec du sulfate de cuivre + de l'hydrate de sodium + du sel de Seignette cette substance donnait un précipité extrêmement glutineux et qu'il était impossible d'éloigner du verre pour en faire le dosage. Il fallait donc trouver un autre précipitant. Après en avoir essayé plusieurs (sels de métaux lourds, acide trichloracétique, et d'autres) qui donnaient des résultats plus

¹⁾ V. Fr. Weis: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI, 96 (1900).

²⁾ V. J. Kjeldahl: Forhandlingerne ved Naturforskermødet i Kjøbenhavn 1892 ou les présents Comptes rendus V, p. X (1900).

ou moins satisfaisants, je me suis décidé, provisoirement, pour l'acide tannique. Réuni à un peu de chlorure ou d'acétate de sodium, celui-ci donnait, non pas seulement de beaux précipités, mais aussi des produits filtrés qui traversaient vite les filtres, et étaient limpides. Il précipitait toute la „glutine“ qui n'avait été soumise à aucune action, mais une partie, seulement, de celle qui avait été soumise à l'action de l'extrait de malt. Le précipité se réunissait vite sous la forme d'une masse volumineuse où le dosage de l'azote était facile à opérer.

Pour éviter un lavage, qui aurait pu redissoudre le précipité en partie, j'ai préféré d'employer, au lieu des précipités, une quote-part des liquides filtrés pour y déterminer, d'après la méthode de Kjeldahl, la quantité d'azote se dérobant à la précipitation par l'acide tannique avant et après la protéolyse. Ce procédé est, à mon avis, beaucoup plus sûr que celui qui opère sur les précipités.

Plus loin dans mon travail j'ai trouvé que le chlorure stanneux est un précipitant excellent pour l'élucidation de certaines phases de la protéolyse sur lesquelles l'acide tannique ne nous renseigne pas. Je parlerai tout-à-l'heure de la valeur et de l'emploi de ces deux substances comme précipitants. Je vais commencer par la description des méthodes employées, de beaucoup le plus souvent, à mes expériences. Le but de celles-ci, que j'indiquerai sous le nom d'expériences modèles, était de trouver les lois générales de l'action des enzymes. Je décrirai plus tard les méthodes appliquées aux cas spéciaux pour trouver certains côtés de la nature des enzymes.

Préparation des extraits de malt.

Toutes mes expériences modèles sont faites avec des extraits de malt vert arrivé au point où — au neuvième jour de germination — la germination est interrompue par la torréfaction à la touraille. Des expériences, dont je parlerai plus loin, ont prouvé que c'est là le moment de la vie de la plantule d'orge où on trouve ordinairement le plus grand pouvoir fermentatif protéolytique, du moins trypsique, quoiqu'il puisse y avoir d'assez grandes différences individuelles entre les différents échantillons de malt.

On prépare toujours les extraits immédiatement après qu'on aura été chercher le malt à la malterie, pour l'empêcher de se sécher à l'air. On écrase le malt en le faisant passer deux fois par un hachoir. Il se forme ainsi une bouillie épaisse, qu'on délaie avec de l'eau. Aux premières expériences je me servais d'une partie de malt pour deux d'eau, mais après, je n'ai mis que quatre parties d'eau pour trois de malt. On obtient ainsi des extraits de malt à la fois plus riches en

azote et plus actifs. La bouillie est délayée dans de l'eau, à plusieurs reprises, pendant 30 à 60 minutes, à la température ambiante. Quelquefois on l'a laissée jusqu'au lendemain dans l'armoire glacière (à 4^0-5^0), mais, en général, je la filtre au bout de la demi-heure ou de l'heure par un filtre plissé sur un entonnoir à nervures. On rejette sur le filtre le premier liquide filtré, répétant l'opération 3 ou 4 fois pendant un quart d'heure, jusqu'à ce qu'il passe parfaitement limpide. On place le tout dans l'armoire glacière, où le filtrage se fait avec beaucoup de lenteur, jusqu'au lendemain. Voici quelques résultats:

de 670 ^{gr}	de malt +	892 ^{cc}	d'eau on obtint	540 ^{cc}	d'extrait de malt
- 890 ^{gr}	—	+ 1187 ^{cc}	—	—	800 ^{cc}
- 1000 ^{gr}	—	+ 1333 ^{cc}	—	—	980 ^{cc}

La matière sèche du malt employé variait considérablement entre 49.35, 50.44, 53.40, 55.99 p. c. Il va de soi que la quantité d'azote varie avec les différentes orges. On verra les variations des chiffres suivants indiquant en milligrammes la quantité d'azote contenue dans 10^{cc} de différents extraits préparés de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau:

Orge de 1898

Orge de 1900

18.35 milligrammes d'azote	15.00 milligrammes d'azote
16.66 — —	19.62 — —
18.37 — —	19.21 — —
16.35 — —	19.66 — —
17.21 — —	18.88 — —
17.70 — —	20.04 — —
19.33 — —	19.10 — —
	18.84 — —

La différence des deux années est assez sensible, tandis que les variations de chaque année, prise à part, sont petites, à une exception près.

De même que les quantités de substance sèche et d'azote varient, on trouve des variations au pouvoir fermentatif des extraits de malt, sans qu'il soit nécessaire de supposer des relations définies entre ces caractères.

En général, on se sert des extraits de malt le lendemain de leur préparation, le jour même où s'est accompli le filtrage. Mais, du reste, ils ne s'affaiblissent aucunement si on les laisse dans l'armoire glacière deux ou trois jours, ou plus longtemps encore, pourvu qu'on les garde à 0^0 , emballés de glace dans un sceau. Aussi, au cas qu'on désire se servir du même extrait pour la comparaison de plus de séries d'expériences qu'on ne peut faire en un jour, a-t-on recours, ordinaire-

ment, à cet emballage de glace qui conserve le pouvoir fermentatif sans affaiblissement pendant près de 8 jours, l'extrait restant frais et limpide tout le temps. — Si, au contraire, on laisse les extraits sans emballage de glace dans l'armoire glacière à 4° — 5° , il se produit, au bout de 3—4 jours, une fermentation acide très forte. Les extraits se troublent, prennent une odeur fétide, finissant par perdre leur pouvoir fermentatif protéolytique. Ainsi qu'il résulte d'expériences décrites plus loin, celui-ci pourra, presque sans affaiblissement, se conserver assez longtemps, de 8 à 10 jours, en ajoutant du toluol. Mais je ne me suis servi de ce préservatif qu'exceptionnellement. L'addition de thymol, de chloroforme, d'aldéhyde formique est impraticable à cause de l'influence nuisible qu'exercent sur les enzymes ces matières (v. plus loin III, 8).

Mesure du pouvoir fermentatif.

Pour suivre la protéolyse, on pourrait soumettre à l'autodigestion l'extrait de malt, qui contient toujours des substances protéiques se laissant modifier ultérieurement par les enzymes protéolytiques. Mais on n'obtient ainsi que des traits peu considérables, quoiqu'un peu plus grands en acidulant l'extrait. En effet, les matières protéiques de l'orge ont déjà été soumises à une protéolyse fermentative pendant la germination, et il n'en reste, au malt vert, qu'une petite quantité à même d'être ultérieurement dédoublée. De tels essais ont été faits en grand nombre, mais surtout à titre de comparaison et de contrôle. — On pourrait aussi faire agir les enzymes, par macération, sur les matières protéiques insolubles à l'eau avec lesquelles elles se trouvent au grain. J'ai fait un assez grand nombre d'essais de ce genre, surtout avec du malt touraillé. Mais on n'obtient ainsi aucun chiffre absolu indiquant l'action fermentative. On trouve bien un changement au rapport pour cent de l'azote resté intact à l'azote dédoublé, mais il n'est pas toujours facile de déterminer l'influence exercée sur ce rapport par les conditions d'extraction.

Si, au contraire, on soumet une substance albuminoïde, pure autant que possible, à la protéolyse par l'action d'un extrait de malt, on pourra exprimer le dédoublement en chiffres absolus, quand même il ne suffit pas d'en faire la simple lecture pour déterminer la loi de l'influence d'un agent, puisqu'on ne peut pas empêcher le changement d'autres agents pendant les expériences.

C'est de cette méthode que je me suis servi pour la plupart de mes expériences en employant la *glutine* de Kjeldahl, l'albumine

soluble dans l'alcool à 55 p. c. et dont j'ai parlé plus haut. Voici comment je l'obtiens¹⁾: On délaie soigneusement de la farine de froment, première qualité, par petites portions dans deux fois son poids d'alcool à 55 p. c. On refroidit à 8°. Au bout de quelque temps on porte la masse sur des filtres Chardin qu'on couvre avec une plaque de verre. Le filtrage se fait très lentement, demandant 3—4 jours. On met le liquide filtré faiblement opalisant et jaunâtre dans un mélange réfrigérant pendant 24 heures. On décante ce qui, pour n'être pas congelé, ne s'est pas réuni au fond sous la forme d'un sirop visqueux. On redissout le sirop dans un petit peu d'alcool à 55 p. c. On continue de refroidir et de redissoudre jusqu'à ce qu'on pense avoir obtenu un produit suffisamment pur. Redissous dans le moins d'alcool à 55 p. c. possible, celui-ci se précipite comme un précipité blanc brillant, si on verse la solution goutte à goutte ou comme un filet mince, dans une grande partie d'alcool absolu. Laissée là-dessous pendant quelque temps, la glutine finit par s'endurcir formant une masse cassante qu'on pulvérise avec un peu d'alcool absolu; on en sépare celui-ci par filtration sur un appareil de Büchner. On lave à l'alcool absolu. Enfin, on fait sécher dans le vide sur de l'acide sulfurique, à la température ordinaire, pendant plusieurs jours. On obtient ainsi une poudre légère et blanche; mais la quantité n'en est que très petite vu la quantité de farine employée (v. le tableau p. 154).

Le plus naturel aurait été, sans doute, de se servir d'une albumine tirée de l'orge ou du malt. Voici, cependant, pour quelles raisons j'ai préféré celle du froment. D'une part, on obtient, par le procédé que je viens de décrire, une quantité beaucoup plus petite d'orge et de malt, et des produits moins purs. Après 6—7 congélations j'ai obtenu, de la farine de malt, un produit qui donnaient des solutions pas toutes claires, d'un jaune sale, opalisantes. Comme j'avais besoin, pour le grand nombre d'essais que je devais faire, de quantités d'albumine considérables, ces faits étaient de grande importance. D'autre part, l'action de l'extrait de malt était beaucoup plus forte sur ma préparation de froment que sur mes préparations d'orge et de malt. Aussi celle-là donnait-elle des traits plus forts de l'action des différents agents, ainsi qu'il résultera des expériences communiquées plus loin. Ici je me bornerai à montrer la quantité de matière obtenue des différentes portions de farine employées.

¹⁾ Kjeldahl indique brièvement la méthode dans sa communication au Congrès des Naturalistes de Copenhague, 1892. Voir aussi les présents Comptes rendus, V p. XI (1900).

en grammes	nombre de congélations	glutine obtenue en grammes	
2375 farine de froment	5	35	= 1.47 pour cent
5000 — — —	2	127	= 2.54 —
5000 — — —	2	170	= 3.40 —
2500 — — —	2	61	= 2.44 —
3000 — — —	2	102	= 3.40 —
4000 — — —	3	141.5	= 3.56 —
2000 farine d'orge...	2	28.2	= 1.41 —
2000 farine de malt ..	6—7	8.4	= 0.42 —

Il faut observer que les oscillations des rendements dépendent non seulement du nombre des congélations, mais aussi de la teneur en eau plus ou moins grande de la farine, de la richesse en azote des céréales, etc.

Kjeldahl appelle, nous venons de le dire, glutine (v. p. 152) l'albumine obtenue ainsi. Il en donne quelques-unes des propriétés caractéristiques, que je suis à même de suppléer de quelques observations nouvelles. En effet, souvent forcé, en variant les conditions de mes expériences, d'examiner la manière de se comporter de cette substance, je me renseignais, à l'occasion, sur ses propriétés physiques et chimiques.

Quant à sa solubilité, cette albumine est insoluble dans l'eau et dans l'alcool au-dessus de 90 p. c., soluble dans l'alcool de force moyenne et dans les alcalis (hydrate de sodium, carbonate neutre de sodium) de concentrations pas trop faibles. Elle se comporte différemment vis-à-vis des acides organiques et des acides minéraux. Pour les premiers, on a examiné ses rapports à l'acide lactique et à l'acide acétique. Les concentrations les plus faibles dans lesquelles 2 p. c. de la préparation se dissolvent entièrement, sont l'acide lactique étendu à 0.05 p. c. (= l'acide titré normal au $\frac{1}{180}$) et l'acide acétique étendu à 0.03 p. c. (= l'acide titré normal au $\frac{1}{200}$), mais la solubilité va en augmentant avec la concentration des acides, du moins jusqu'à l'acide lactique étendu à 4 p. c. et à l'acide acétique étendu à 6 p. c., les concentrations les plus fortes examinées de ces acides. Dans l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, au contraire, elle n'est soluble qu'au-dedans de limites très étroites. En faisant bouillir, on est à même de dissoudre entièrement 2 p. c. de la préparation dans des concentrations d'acide sulfurique variant entre l'acide titré normal au $\frac{1}{400}$ et au $\frac{1}{10}$. Mais en refroidissant jusqu'à la température ordinaire, une partie se dépose de nouveau si les concentrations sont plus faibles que la liqueur acide normale au $\frac{1}{200}$ ou plus fortes que celle au $\frac{1}{40}$. La solution reste limpide dans les concentrations intermédiaires sauf la solution dans une liqueur titrée normale au $\frac{1}{50}$, qui devient opalisante. Il faut considérer que la sub-

stance est insoluble dans l'acide sulfurique d'une concentration au-dessus de 0.49 p. c. (= une liqueur titrée normale au $1/10$), le maximum de solubilité se trouvant autour d'une concentration de 0.049 p. c. = (une liqueur titrée normale au $1/100$). Il en est, en réalité, de même de l'acide chlorhydrique, à cela près que la solubilité est généralement un peu plus grande.

Ces solutions supportent l'ébullition sans coagulation de l'albumine. Une solution dans l'acide lactique à 0.4 p. c. — c'est l'acide dont je me suis servi le plus souvent — se conserve extrêmement bien, surtout si on la laisse à une température basse (4° — 5°). Si une partie de l'eau s'évapore, une masse gélatineuse et transparente finit par se déposer.

Le pouvoir rotatoire de la glutine a été étudié par Kjeldahl. Il l'a trouvé:

dans l'alcool à 55 p. c	pour $\alpha_D = \div 92^{\circ}$
— le vinaigre glacial	— - = $\div 81^{\circ}$
— l'acide acétique à 0,1—5 p. c.	— - = $\div 111^{\circ}$
— le phénol à 40°	— - = $\div 130^{\circ}$

Kjeldahl fait remarquer que le chiffre qu'il a trouvé pour le pouvoir rotatoire — en tout cas en solution alcoolique — est tellement constant qu'il l'a trouvé le même dans des préparations de froment des climats les plus divers (froment de Danube, froments californien et danois) et de quatre années différentes.

Il trouva la même stabilité à la quantité d'azote, qui ne déviait jamais beaucoup de 17.25 p. c. Dans deux préparations, que j'ai examinées à cet égard, j'ai trouvé 17.18 et 17.22 p. c. d'azote, ce qui paraît s'accorder assez bien avec les chiffres de Kjeldahl.

On précipite la glutine complètement (v. le tableau p. 158) par certains précipitants, l'acide tannique, par exemple, additionné d'un peu de solution saline (acétate de sodium ou chlorure de sodium). On en précipite environ 98 p. c. (97.9 p. c.) par une solution de sulfate de zinc. De deux préparations on a précipité 94.9 et 95.6 p. c. respectivement de la quantité totale d'azote par le chlorure stanneux additionné de chlorure de calcium. L'action de l'acide lactique ne change en rien ces réactions. M. Schjerning, chef de laboratoire de Ny Carlsberg, ayant eu un petit échantillon d'une de mes préparations, en a étudié les réactions avec des précipitants dont il a l'habitude de se servir. Il a bien voulu me communiquer les chiffres suivants, qui expriment la quantité d'azote total précipitée en deux dosages parallèles:

	I	II
Par du chlorure stanneux	94.7 p. c.	et 92.7 p. c.
- du chlorure mercurique	96.1 —	- 94.8 —
- de l'acétate de fer + du phosphate disodique	55.3 —	- „ —

	I		II
Par de l'acétate de fer + du phosphate acide de calcium	„	p. c. et 64.6 p. c.	
- de l'acétate uranique	94.7	— -	94.8 —
- du sulfate de magnésium	96.1	— -	96.8 —
erreur admissible	1.4	— -	1.1 —

Peut-être a-t-on ici, contrairement à ce que pensait Kjeldahl, un mélange de deux ou de plusieurs corps. Ce qui semble l'indiquer, c'est qu'aucun des précipitants appliqués ne donne, comme le fait l'acide tannique, une précipitation complète. Il n'y a pas lieu, cependant, de discuter ici cette question, d'autant plus qu'en choisissant cette substance ce n'est pas un corps absolument pur — un individu chimique — que j'ai cherché. Ce qui m'a guidé, ce sont les considérations que voici: 1° ce corps est-il susceptible de l'action de l'extrait de malt? 2° donne-t-il des précipitations bien prononcées et qui permettent de suivre la protéolyse quantitativement? Sous ces deux rapports son action a été toute satisfaisante¹⁾.

Enfin j'ajouterai²⁾ qu'en faisant bouillir ce corps avec de l'acide chlorhydrique à 20 p. c. et de l'étain on obtient constamment de 29.4 à 29.6 p. c. d'ammoniaque, qu'on ait étendu la décomposition à quatre ou à huit fois vingt-quatre heures.

Dans son rapport fait au Congrès des Naturalistes de Copenhague, 1892, Kjeldahl, nous venons de le dire, a appelé ce corps glutine. C'est aussi de ce nom qu'il se servait tous les jours au laboratoire. Mais il n'a jamais, que je sache, donné ses raisons du choix de ce nom. Peut-être a-t-il seulement voulu le distinguer, tout court, de la vieille conception de gluten de Ritthausen, tandis que, d'autre part, on ne peut, à son avis, l'identifier avec aucune des trois matières albuminoïdes solubles dans l'alcool (fibrine, gliadine, mucédine) qu'on pense avoir trouvées plus tard dans le froment³⁾. A l'avis de Kjeldahl, il n'y a qu'une seule albumine soluble dans l'alcool, ses préparations ayant toujours donné la constante sus-dite par rapport à l'azote et au pouvoir rotatoire. Cependant, il faut se demander si les faits connus de ce corps autorisent à l'emploi d'un terme réservé jusqu'ici, dans la terminologie scientifique, aux matières collagènes. A mon avis, il ne faudrait pas, malgré certaines ressemblances avec celles-ci, étendre le terme de glutine aux matières albuminoïdes végétales, avant d'en avoir établi la nature par la détermination et l'étude soigneuses de leurs propriétés physiques

¹⁾ Ce serait un problème assez intéressant que la détermination de sa pureté, de ses dédoublements sous l'action d'acides, d'alcalis, etc., et, avant tout, de sa place parmi les matières protéiques déjà étudiées avec plus d'exactitude.

²⁾ D'après des renseignements qu'a bien voulu me fournir mon collègue M. C. Pedersen.

³⁾ Osborne & Voorhees, v. Griessmayer: Die Proteïde der Getreidearten, 2 édition p. 95 (1897).

et chimiques. Quoique, dans une communication provisoire, publiée à la „Zeitschr. für physiol. Chemie“, je me sois déjà servi de ce nom en parlant de cette préparation, je préférerai, dans la suite, de l'appeler, en général, protéine et, plus particulièrement, protéine de froment, de malt, d'orge, etc., évitant ainsi d'anticiper un terme mieux approprié et qu'on pourrait trouver plus tard.

Si, à une température convenable, on fait agir un extrait de malt sur une telle solution de protéine, faiblement acide, la protéine subit une transformation — qui finit par devenir presque complète — laquelle se manifeste de différentes manières, soit en se dérochant à la précipitation par certains précipitants, soit en se faisant dialysable, soit en donnant des réactions nouvelles de coloration, soit en se dédoublant en substances toutes nouvelles et dont on peut constater la présence dans le liquide. Quelque chose de semblable arrive, mais à un degré moindre, pour un extrait de malt auquel on n'a pas ajouté de protéine, les matières albuminoïdes ayant été exposées, déjà pendant la germination, à l'action des ferments protéolytiques. Ainsi il se présente plusieurs méthodes pour suivre la protéolyse, et je me suis servi, dans des buts différents, de méthodes différentes. Dans le plus grand nombre d'expériences, cependant, j'ai eu recours, je l'ai déjà dit, aux réactions des précipitants et surtout de deux, dont je vais parler plus en détail: l'acide tannique et le chlorure stanneux.

Voici les indications qu'on trouve dans la littérature¹⁾ au sujet de l'acide tannique: il précipite complètement les albumines proprement dites (ovalbumine, caséine, lactalbumine), mais incomplètement les produits de leur dédoublement (albumoses, vraies peptones) et, parmi eux, les peptones se dissolvent de nouveau complètement dans un excès du précipitant (Sebelien). Il y a pourtant, à cette précipitation, plusieurs circonstances secondaires à observer: les substances albuminoïdes qui ne contiennent pas de parties minérales ne se précipitent pas complètement, à moins d'ajouter un sel en petite quantité (chlorure de sodium, acétate de sodium, chlorure de calcium, sulfate de magnésium, etc.); la précipitation doit se faire à froid; le degré de dilution et la quantité du précipitant exercent de l'influence, etc. Puis le dissolvant de l'acide tannique n'est pas indifférent. Sebelien indique une solution spiritueuse d'après le récépé d'Almén²⁾ (4^{gr} de tannin, 8^{cc} d'acide acétique à 25 p. c., et 190^{cc} d'alcool de 40—50 p. c.). Pour moi, je me suis toujours servi d'une solution aqueuse à 5 p. c.

¹⁾ V., par exemple, Sebelien: Studier over Æggehvidestoffernes analytiske Bestemmelse med særligt Hensyn til Mælk. Videnskabernes Selskabs Oversigter 1888, 81—126 et Zeitschr. für physiol. Chemie XIII, 135—180 (1889).

²⁾ Almén: Upsala läkareföreningens förhandlingar 1870.

Expériences	Solution de protéine à 2 p. 100				Apparence du liquide après la précipitation	Dosage d'azote du liquide filtré			Apparence du liquide filtré		
	Extrait de malt	Solution d'acétate de sodium	Solution d'acide tannique	Récipient à H ² SO ⁴ titré normal au 1/7		titre par l'hypo-sulfite	Az en milligr.				
No.	cc	cc	gouttes	cc		cc	cc				
294	10	0	0	10	{ le liquide ne se laisse pas filtrer	10	"	"	très troublée } précipité abondant par l'addition d'un surplus d'acide tannique		
295	—	—	6	1		—	12.21	14.80			
296	—	—	—	2	{ liquide suspendu très troublé	—	15.90	7.42			
297	—	—	—	3		—	19.31	0.60			
298	—	—	—	4	{	—	19.58	0.06	faiblement troublée. Filtration lente. Plus de précipité par l'addition d'acide tannique		
299	—	—	3	5		—	19.58	0.06			
300	—	—	—	6	{ liquide faiblement opalisant	—	19.60	0.02	— } pas de précipité par l'addition d'un surplus d'acide tannique		
301	—	—	—	7		—	19.60	0.02			
302	—	—	—	8		—	19.56	0.10			
303	—	—	—	9		—	19.62	÷ 0.02			
304	—	—	—	10	liquide clair	—	19.60	0.02	—		
305	—	—	—	20	{ liquide clair, jaune	—	19.58	0.06	—		
306	—	—	—	30		—	19.58	0.06	—		
307	—	10	0	1	{ liquide suspendu encore plus troublé qu'en 295—298	—	8.40	22.42	troublée } précipité abondant par l'acide tannique		
308	—	—	—	2		—	12.37	14.48			
309	—	—	—	3		—	13.58	12.06			
310	—	—	—	4		—	14.44	10.34			
311	—	—	—	5	{	—	14.56	10.10	— } très troublée par l'acide tannique		
312	—	—	—	6		—	14.60	10.02			
313	—	—	—	7		{ liquide parfaitement clair. Tous essais pareils	—	14.60		10.02	— } opalisante, mais de moins en moins, par l'acide tannique
314	—	—	—	8			—	14.60		10.02	
315	—	—	—	9	—		14.58	10.06			
316	—	—	—	10	—		14.65	9.92			
317	—	—	—	20	{	—	14.68	9.86	— — — — —		
318	—	—	—	30		—	14.70	9.82			
319	—	50	—	30	{ opalisant, opaque	(39.41)			titre de 20 ^{cc} H ² SO ⁴		
320	0	10	—	10		20	15.36	48.10			
321	10	0	3	30		10	14.62	9.98			
322	12 cc	d'acide sulfur. conc.			{ cinq jours de repos. Filtration	10	19.58	0.06	— — — — —		
323	—	—	—	—		10	19.62				
						10	19.60	19 ^{cc} .61	de solution d'hypo-sulfite normale au 1/14		
						—	19.62				

Comme il était de la plus grande importance de connaître l'action de ce précipitant sur l'extrait de malt et sur ma préparation de protéine, j'ai fait un grand nombre d'essais à ce sujet.

A cet effet, j'ai employé un extrait de malt préparé de 700^{gr} de malt vert écrasé + 900^{cc} d'eau distillée (faisant 650^{cc} d'extrait), une solution de protéine à 2 p. c. dans de l'acide lactique aqueux à 0.4 p. c. et une solution d'acide tannique à 5 p. c. J'examine d'abord l'influence de l'addition de quelques gouttes d'une solution d'acétate de sodium à 5 p. c. pour apprendre si la précipitation est totale. On voit alors que, dans l'extrait de malt, la précipitation s'opère mieux sans addition qu'avec addition d'acétate de sodium, celui-ci empêchant plutôt le précipité de se déposer aussi rapidement qu'il fait sans la présence de l'acétate. En effet, l'extrait de malt contient un grand nombre de sels minéraux; il est donc superflu d'en ajouter encore. Dans une solution pure de protéine, au contraire, l'addition d'un petit peu d'acétate de sodium est de la plus grande importance pour obtenir une précipitation complète et un liquide filtré clair, tandis qu'elle n'est pas nécessaire dans un mélange d'extrait de malt et de solution de protéine. Les essais inscrits au tableau ci-contre doivent nous renseigner sur les points suivants: 1° quelle est la quantité d'acide tannique nécessaire pour précipiter d'une quantité déterminée d'extrait de malt ou de solution de protéine toute la matière précipitable? 2° l'excès d'acide tannique redissout-il une partie du précipité?

La précipitation se fait dans des fioles jaugées, en remplissant plus tard d'eau distillée. La filtration ne se fait que le lendemain. Pour doser l'azote d'après la méthode de Kjeldahl, on emploie 50^{cc} du liquide filtré. (Pour les détails v. p. 163):

Si, aux essais où on a employé 10^{cc} d'extrait de malt, la teneur en azote des liquides filtrés ne descend pas notablement au-dessous de 10^{mg} c'est que l'extrait de malt contient des matières azotées (bases hexoniques, corps amidés, ammoniacque, etc.), produites, probablement, par l'action des enzymes dans le grain en germination, et lesquelles se dérobent à la précipitation par l'acide tannique. Ordinairement ces matières constituent la moitié de l'azote total. Aucun dosage d'azote n'a été fait pour l'extrait de malt en question ici. Mais voici, à titre de comparaison, quelques chiffres pris à d'autres expériences: en 10^{cc} de différents extraits de malt on trouve:

Az total	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique	
	quantité trouvée	quantité pour 100 d'azote total
18.35 milligrammes	8.57 milligrammes	46.7
18.37 —	8.61 —	46.3

Az total		Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique	
		quantité trouvée	quantité pour 100 d'azote total
16.35	milligrammes	7.47	milligrammes 45.1
17.70	—	8.80	— 49.7
17.21	—	7.65	— 44.5
19.33	—	9.73	— 45.2
18.88	—	9.98	— 52.9
20.04	—	10.00	— 49.9
18.84	—	8.68	— 46.1
19.33	—	10.15	— 52.5
18.20	—	8.20	— 45.1
18.46	—	9.50	— 51.6
21.04	—	10.00	— 48.0

Voici les résultats de ces essais: 1° Pour la précipitation totale de 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. il faut 3^{cc}—4^{cc} d'une solution d'acide tannique à 5 p. c. + quelques gouttes d'une solution d'acétate de sodium à 5 p. c. 2° La précipitation totale d'un mélange de 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. et de 10^{cc} d'extrait de malt tout frais (préparé de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau) demande 4^{cc}—5^{cc} d'acide tannique en solution à 5 p. c. 3° L'apparence troublée ou opalisante du liquide suspendu indique une précipitation incomplète, sans qu'un liquide filtré clair soit le criterium d'une précipitation totale (expériences 309—310). 4° L'excès d'acide tannique jusqu'à 30^{cc} ne redissout pas le précipité déposé, pas même au bout de cinq jours de repos. — Aussi plus tard, aux expériences modèles, employait-on toujours 10^{cc} d'acide tannique pour la précipitation de 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt.

Toutes les précipitations en question sont faites à la température ordinaire du laboratoire. Mais en faisant des expériences à des températures plus élevées, on ne peut ne pas se demander si on peut interrompre ces expériences simplement en ajoutant le précipitant, ou s'il faut recourir à un refroidissement préalable. A ce sujet on a fait les essais suivants:

On employait 10^{cc} de la solution de protéine (à 2 p. c.), de l'extrait de malt et de la solution d'acide tannique (à 5 p. c.) respectivement. Avant de les mélanger, on chauffe ou on refroidit les parties à la température de la précipitation. On laisse les parties 10 minutes encore à cette température avant de diluer par de l'eau (à la température ordinaire). A toutes les températures on fait des déterminations doubles:

Expé- riences	Tempé- rature	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Remarques
Contrôle	(10 ^{cc} de H ² SO ⁴ concentré	{19.60} {19.62}	19.61		
324 325	} 2°	{14.28} {14.44}	14.36	10.50 ^{mg}	{ à 2° l'acide tannique se fait laiteux, mais il reprend sa limpidité en se redissolvant si on tient la fiole quelques instants entre les mains.
326 327	} 9°	{14.30} {14.28}	14.29	10.64 ^{mg}	
328 329	} 18°	{14.26} {14.23}	14.25	10.72 ^{mg}	
330 331	} 25°	{14.30} {14.26}	14.28	10.66 ^{mg}	
332 333	} 47°	{14.04} {14.00}	14.02	11.38 ^{mg}	
334 335	} 100°	{10.63} {12.95}	11,79	15.64 ^{mg}	{ le liquide suspendu était une émulsion laiteuse

Voici ce que nous apprennent ces expériences : 1° la précipitation est la même aux températures entre 2° et 25°; 2° elle est incomplète à 47° et à 100°; 3° si on fait la précipitation à une température élevée elle reste incomplète, quand même on refroidit à une température plus basse — résultat auquel arrive aussi Sebelien¹⁾.

Il est donc de la plus haute importance de ne pas précipiter par l'acide tannique à une température trop élevée. Aussi à tous les essais suivants ai-je refroidi les fioles en les portant sous la fontaine avant d'ajouter l'acide tannique.

Une tout autre phase de la protéolyse se révèle en employant le chlorure stanneux, l'autre précipitant dont je me suis souvent servi. Ce n'est qu'assez tard que mon attention a été attirée sur l'avantage que présente, pour mon but, l'emploi de cette substance. En me servant de ce précipitant, j'ai essayé de déterminer l'influence de différents agents d'un intérêt général sur cette autre phase.

C'est en m'efforçant de trouver les caractères qualitatifs de la protéolyse au moyen de précipitants différents que j'ai rencontré le chlorure stanneux, qui était parmi des précipitants de protéine qu'avait

¹⁾ l. c. p. 90.

recommandés Schjerning. En faisant varier soit la durée de l'expérience, soit la température, j'obtenais des courbes de précipitations de positions différentes, celle du chlorure stanneux offrant un intérêt tout particulier, ainsi qu'on verra par les résultats donnés plus loin.

D'après Schjerning¹⁾, on prépare une solution de chlorure stanneux de 50^{gr} d'étain râpé qu'on fait digérer, dans une fiole tarée, avec une forte quantité d'acide chlorhydrique concentré bouillant, jusqu'à la dissolution de tout l'étain. On évapore jusqu'à ce que le contenu de la fiole pèse 130^{gr} environ. La solution chlorhydratée de chlorure stanneux, portée à un litre en étendant d'eau distillée, est filtrée. Pour prévenir l'oxydation, on distribue la solution dans de petits flacons, qu'on remplit jusqu'aux bouchons de verre fermant hermétiquement. Ce précipitant ne précipite pas non plus les matières protéiques qui ne contiennent pas de cendres ou qui n'en contiennent que très peu. Aussi Schjerning recommande-t-il d'ajouter 5—10^{cc} d'une solution de chlorure de calcium à 10 p. c., ce que j'ai fait à toutes mes précipitations.

Nous avons déjà dit que le chlorure stanneux précipite 95 p. c. de la solution de protéine de froment. Il précipite beaucoup moins de l'azote de l'extrait de malt que ne fait l'acide tannique. Celui-ci précipite environ 50 p. c. (v. le tableau p. 158), tandis que le chlorure stanneux ne précipite qu'un peu au-delà de 30 p. c. (en deux cas 32 et 33.5 p. c.). Mais, si on précipite le mélange d'une solution de protéine et d'un extrait de malt, la quantité précipitée est moins grande que celle de deux précipitations séparées, sans qu'on en con-

	Solution de protéine à 2 p. c.	Extrait de malt	Az total	Az précipité par Sn Cl ²		
				quantité absolue	pour 100 d'Az total	
Expériences nos. 1613— 1630	cc	cc	mg	mg	pour 100	calculé trouvé
	10	"	33.68	31.96	94.9	
	"	10	19.10	6.40	33.5	
	10	10	52.78	38.36	72.7	
	10	10	52.78	36.58	69.3	
Expériences nos. 1917— 1930	10	"	31.74	30.30	95.6	calculé trouvé
	"	10	18.54	5.93	32.0	
	10	10	50.28	36.23	72.1	
	10	10	50.28	34.75	69.1	

¹⁾ V. Schjerning: Fresenius' Zeitschr. für anal. Chemie XXXIII 263 (1894), XXXIV, 135 (1895), XXXV, 285 (1896), XXXVI, 643 (1897), XXXVII, 73 (1898), XXXVII, 413 (1898), XXXIX, 545 (1900).

naissance la cause. Le tableau suivant fera connaître les déviations dont il s'agit (v. p. 162):

A ces précipitations on employait 10^{cc} de solution de chlorure de calcium et 20^{cc} de solution de chlorure stanneux, toute la matière précipitable ne se précipitant pas par moins de 15^{cc} de chlorure stanneux. Pour éviter de trop fortes dilutions, on faisait les précipitations dans des fioles de 50^{cc}. On laissait les fioles bouchées de bouchons de liège (pour empêcher l'accès de l'oxygène) jusqu'au lendemain. Puis on filtrait. Pour obtenir un liquide filtré limpide, il fallait souvent rejeter, à plusieurs reprises, sur le filtre les premières parties filtrées. Le trouble subséquent était dû à l'oxydation du chlorure stanneux. On dosait l'azote de la moitié du liquide filtré (25^{cc}) après l'avoir évaporé avec précaution, en ajoutant un peu d'acide sulfurique concentré, à l'étuve à 100°. —

Voici quelques indications du dosage d'azote d'après Kjeldahl qui pourraient avoir de l'intérêt. On fait les dosages, nous venons de le dire, aux liquides filtrés en y prenant la moitié du volume primitif du liquide d'expérience: 50^{cc} et 25^{cc} respectivement, les fioles jaugées contenant 100^{cc} ou 50^{cc}. Avant l'évaporation on ajoute 1^{cc} environ d'acide sulfurique concentré; on évapore les solutions contenant l'acide tannique sur une flamme nue jusqu'à l'apparition de fumées d'acide sulfurique. Il n'y a pas moyen d'en faire autant avec les liquides filtrés au chlorure stanneux, l'ébullition produisant des soubresauts et des projections à l'intérieur des fioles. On met donc celles-ci à l'étuve chauffée à 100°. Si on les y laisse la nuit durant, l'évaporation sera assez avancée pour que le lendemain la décomposition par l'acide sulfurique puisse se faire sans soubresaut ni projections ni formation de mousse. Pour la décomposition on emploie, en général, 10^{cc} d'acide sulfurique concentré et une spatule d'oxyde de cuivre. Cependant l'expérience m'a bientôt appris que, pour arriver à une décomposition complète, il faut continuer l'ébullition avec l'acide sulfurique + l'oxyde de cuivre assez longtemps — 4, 5, 6 heures — même après que le liquide sera devenu clair, pour que l'oxydation subséquente par le permanganate de potassium change tout l'azote en ammoniac. On fait la distillation et le titrage (d'acide sulfurique titré normal au $\frac{1}{7}$ sur de l'hyposulfite de sodium, d'une force telle que 1^{cc} est équivalent à 1^{mg} d'azote) tout à fait de la manière indiquée par Kjeldahl¹⁾.

Expériences modèles. — Pour examiner l'influence d'un agent sur la protéolyse, il faut que tous les autres agents soient constants. Aussi, après des expériences d'orientation, ai-je choisi, pour

¹⁾ Kjeldahl: Ces Comptes-rendus II, 193 (1883).

mon procédé d'expériences, un type modèle dont j'ai déjà parlé en passant, mais que je vais maintenant définir en détail. A un tel choix, il importe de trouver les conditions les plus favorables à l'action des enzymes. En même temps, il faut trouver une mesure facile et pratique de cette action et faire le plus grand nombre possible d'essais pendant la période où une quantité variable, par exemple, le pouvoir fermentatif de l'extrait, reste assez constante. A part l'agent, que j'ai fait varier exprès ou que j'ai remplacé par un autre différent, l'expérience se fait de la manière suivante:

On emploie des volumes égaux (10^{cc}) d'un extrait de malt à 18^{mg}—20^{mg} d'azote, fraîchement préparé de 3 parties de malt vert écrasé + 4 parties d'eau, et d'une solution de protéine de froment à 2 p. c., contenant 30^{mg} d'azote environ, dans une solution d'acide lactique à 0.4 p. c. On a ainsi, au mélange, une concentration de la protéine de froment à 1 p. c. qui donne, dans les 20^{cc} de liquide, conjointement avec les matières albuminoïdes de l'extrait de malt, la teneur totale en azote de 50^{mg}. L'acidité est donc de 0.2 p. c. d'acide lactique, outre les phosphates acides de l'extrait de malt. Le liquide est mis dans des fioles jaugées de 100^{cc} ou de 50^{cc}, placées dans des bains-marie (comme bains-marie on s'est servi de petits brassins); la température est de 47°—48° si on précipite par l'acide tannique; elle est de 50°—51° si c'est le chlorure stanneux qui sert de précipitant. Si on emploie les deux précipitants la température est, en général, de 50°. L'expérience dure 2 heures ou, en plusieurs séries d'essais, 3 heures. On arrête les essais en ajoutant les précipitants, pourtant pas avant d'avoir fait refroidir sous la fontaine si c'est l'acide tannique qui est le précipitant. On emploie 10^{cc} de solution d'acide tannique à 5 p. c. (+ un peu d'acétate de sodium), ou 20^{cc} de solution de chlorure stanneux, après l'addition de 10^{cc} de solution de chlorure de calcium à 10 p. c. Plus tard, on ajoute de l'eau distillée jusqu'au trait. On laisse les fioles jusqu'au lendemain ou plus longtemps, puis on filtre, on évapore, on décompose, on distille, on titre de la manière indiquée plus haut. Si le chlorure stanneux sert de précipitant il faut boucher les fioles. — On a toujours, cela va sans dire, fait des déterminations de contrôle au liquide à essayer par des précipitations directes avant que les enzymes aient pu agir, ce que j'appelle essais passifs par opposition aux essais actifs. On a presque toujours fait des essais doubles et des dosages parallèles dont on a tiré les moyennes, à moins que, pour des raisons particulières (des accidents pendant les opérations) il n'ait fallu en rejeter l'un.

Là où, dans ses traits principaux, la marche des expériences

diffère de celle qu'on vient de décrire, ce qui est le cas, par exemple, pour les essais de diffusion ou les recherches sur des propriétés déterminées des enzymes, on donnera, plus loin, tous les détails nécessaires.

III.

Lois générales de la protéolyse.

M'étant convaincu, par nombre d'expériences d'orientation, qu'un extrait aqueux de malt vert a des propriétés protéolytiques et qu'il est à même de transformer des matières protéiques étrangères, dans l'espèce la protéine de froment déjà nommée qui, dans des conditions convenables, se soustrait, en tout ou en partie, à la précipitation par certaines substances au bout d'un certain temps d'action des enzymes, j'ai passé à l'examen de l'influence qu'exercent, sur cette transformation, des variations apportées aux conditions des expériences. Pour obtenir des résultats comparables, il fallait opérer de manière à ne faire varier, autant que possible, dans la même suite d'expériences que le seul facteur dont on va mesurer l'influence.

Les facteurs qui ont été examinés ainsi sont partie ceux qui, comme la température, la quantité d'enzyme, la durée de l'expérience, etc., modifient généralement l'action des enzymes, partie ceux dont on ignore d'avance s'ils ont de l'influence, dans un sens ou dans un autre, comme les matières étrangères du milieu. Les résultats sont exprimés quantitativement par des chiffres indiquant la quantité d'azote qui, pendant les expériences, s'est soustraite à la précipitation par les précipitants employés, et, où il y a moyen, encore graphiquement par des courbes en prenant pour abscisses le facteur variant, pour ordonnées l'azote dédoublé, indiqué en milligrammes.

Je me suis toujours servi d'extraits de malt préparés de la même manière et d'une albumine toujours la même dans une solution et à une concentration toujours les mêmes (v. p. 164). Par conséquent, les lois trouvées pour la marche de la protéolyse dans des conditions variées, ne peuvent être déclarées valables que pour cet extrait-là de malt, et pour cette albumine-là. Aussi ne vais-je pas plus loin dans mes affirmations, en admettant qu'un procédé d'expérience différent donnerait des résultats différents. Cependant, je suis d'avis qu'il y a une certaine vraisemblance que, pour l'essentiel, la protéolyse se conforme aux lois trouvées aussi en se trouvant sous des conditions différentes, si elle se passe hors de la cellule vivante. Je pense aussi que ces lois donneront des indications ou des renseignements qui feront mieux comprendre ce qui se passe à l'intérieur de la cellule, où la protéolyse est réglée par le concours compliqué de tant d'autres

fonctions vitales qu'il sera extrêmement difficile ou, pour mieux dire, impossible de retracer, schématiquement, sa dépendance d'un seul agent extérieur.

Ce n'est que peu à peu que j'ai vu clairement combien est compliquée la transformation de la protéine de froment traitée ici. En effet, ce n'est qu'au fur et à mesure que mon travail s'avancait et surtout lorsque j'ai mis la dernière main à l'ensemble de mes matériaux que j'en ai eu la reconnaissance nette. Comme cette transformation n'est accompagnée d'aucun dégagement de gaz, ni de la production de corps insolubles ou odorants, elle n'est pas directement perceptible à nos sens, différente ainsi d'autres fermentations, produites par des bactéries et des levûres (putréfaction, fermentation alcoolique). Néanmoins, elle ne le cède à ces fermentations ni en intensité ni en dédoublement profond de molécules compliquées, l'albumine se dédoublant très vite, presque totalement, en albumoses (et en peptones), puis se décomposant ultérieurement pour former des composés cristallins non protéiques, descendant même, en partie, à la molécule d'ammoniaque minérale¹⁾.

Il résulte encore de mes essais que les différentes phases de ce dédoublement ne sont pas toutes également influées d'agents extérieurs, mais qu'en partie chacune d'elles suit ses lois. J'ai réussi, à ce que je crois, à distinguer assez rigoureusement deux, au moins, de ces phases: celle qui se découvre à la précipitation par le chlorure stanneux, et celle qui se découvre à la précipitation par le tannin. J'ai réussi aussi, ou à peu près, à les produire indépendamment l'une de l'autre. Je pense donc avoir démontré ainsi, et par d'autres indices, l'existence de deux enzymes, au moins, comme causes de la protéolyse en question.

Ce point de vue m'ayant guidé dans la représentation suivante des résultats particuliers, j'anticipe ici sur ce qui en ressortira, faisant ces observations partie pour orienter le lecteur, partie pour expliquer les expressions et les termes dont, pour être bref, je me suis servi, avant de les avoir fondés sur des raisons.

Il existe donc, à mon avis, dans l'orge en germination et dans

¹⁾ Comme il n'y a plus moyen de maintenir de distinction rationnelle entre les fermentations qui ne paraissent résulter que de l'action directe de microbes sur les matières fermentescibles et celles qui s'effectuent en dehors de la cellule vivante au moyen d'enzymes, on a le même droit d'appeler fermentation cette protéolyse qu'on a d'indiquer ainsi le dédoublement en alcool et en acide carbonique de la molécule du sucre au moyen de levûres ou de zymase. Il se peut bien que toutes les fermentations soient des effets d'enzymes qui ne sont pas nécessairement dus à des microbes. Voir aussi Johs. Schmidt et Fr. Weis: „Die Bakterien“, Jena, Fischer (1902, p. 218—221).

l'extrait qu'on en fait, deux enzymes. A celle des deux qui effectue les premières phases de la protéolyse (le dédoublement en albumoses et en peptones), j'applique le vieux terme de peptase, à l'autre, qui continue le dédoublement au-delà des peptones, celui de tryptase, d'après la ressemblance que portent ces enzymes aux enzymes animales correspondantes : la pepsine et la trypsine¹). Dans le même sens je parlerai de la phase ou de l'action pepsique et de la phase ou de l'action tryptique, coïncidant avec les nombres et les courbes trouvés par les précipitations par le chlorure stanneux et par le tannin respectivement.

1. Dépendance de la température.

Parmi les traits caractéristiques des actions chimiques des enzymes, comparées à d'autres actions chimiques semblables telles que l'hydrolyse des hydrates de carbone sous l'action d'acides étendus, il faut nommer leur dépendance de la température. Certaines enzymes produisent la même hydrolyse d'un certain corps que les acides, mais tandis que l'action de ceux-ci est d'autant plus énergique que la température est plus élevée, l'action des enzymes s'arrête complètement à un maximum de température, situé, en général, au voisinage de 70°, et jamais beaucoup au-delà, étant le plus énergique à une température plus basse, l'optimum, située, le plus souvent, entre 40° et 60°. Et si on a, une fois, chauffé une enzyme en solution au maximum, il est impossible, en baissant la température, de lui rendre son activité : elle est détruite ou „morte“ une fois pour toutes. Il y aussi une température minima, située, en général, à quelques degrés au-dessus de zéro et au-dessous de laquelle l'enzyme reste inerte ; mais, en ce cas, elle n'est pas détruite, quand même on la soumet à la congélation à des températures très basses : elle reste inerte seulement jusqu'à ce qu'on la rechauffe au-delà du minimum. Ainsi l'action diastasique, ou le pouvoir fermentatif, va en croissant — lentement — avec la température du minimum à l'optimum, et de là — assez brusquement — en

¹) Du reste, je suis d'avis qu'il faudrait appliquer les termes de peptase et de tryptase comme noms communs à toutes les enzymes protéolytiques de nature pepsique et de nature tryptique, tout en retenant les noms de pepsine et de trypsine comme spécifiques aux enzymes animales, suivant l'usage généralement adopté. — Dans l'aperçu des fermentations que j'ai donné dans l'ouvrage de Schmidt et Weis: „Die Bakterien“, Jena, 1902, p. 231—32, je me suis servi du terme de peptase, mais pas encore de celui de tryptase. La raison en est qu'en vue de la confusion générale de la nomenclature de l'enzymologie, je n'ai pas voulu y introduire des termes nouveaux dans un livre étant plutôt un cours élémentaire.

décroissant jusqu'au maximum. L'action des acides, au contraire, va en croissant assez proportionnellement à la température jusqu'au point d'ébullition de la solution. On pourra donc conclure de l'aspect de la courbe de la température si on a affaire à une action d'enzymes (fermentation) ou à une action chimique, produite par d'autres moyens¹⁾.

Les actions diastasiques propres s'accordent, dans un grand nombre de phénomènes, avec les fonctions des cellules qui suivent toujours des courbes semblables. Comme les enzymes proviennent toujours de cellules vivantes, paraissant jouer un rôle extrêmement important pour les rapports entre celles-ci et le monde extérieur, cet accord n'a rien de surprenant. Remarquons seulement que les points cardinaux des courbes de température se déplacent quand l'enzyme est isolée de la cellule. En tout cas, le point du maximum et le point de l'optimum se trouveront alors, en général, plus haut, parce que, le plus souvent, déjà à des températures voisines de 50° la cellule meurt, amenant la destruction de ses enzymes. L'explication en est peut-être qu'à l'intérieur de la cellule il y a des températures plus élevées que nous ne supposons généralement, ou bien que l'énergie nécessaire se produit sous d'autres formes que celle de la chaleur. Sans approfondir cette question, je ferai observer que l'optimum de cette protéolyse se trouve à une température (environ 50°) qui ferait mourir la plantule de l'orge en germination, et qu'on ne saurait directement appliquer les résultats acquis ici au travail qui se fait à l'intérieur des cellules desquelles sont produites les enzymes.

Néanmoins, il est de la plus grande importance de connaître avec exactitude l'influence de la température sur les différentes phases de la protéolyse, partie pour pouvoir caractériser les enzymes qui en sont la cause, partie parce qu'en examinant l'influence des autres facteurs, il est important de connaître la température à laquelle on peut s'attendre aux effets les plus grands, vu qu'il est toujours préférable d'opérer à la température optima. Aussi la détermination des courbes de température était-elle parmi les premiers problèmes que j'ai essayé de résoudre au moyen de la précipitation par le tannin d'abord, puis après, au

¹⁾ Les actions catalytiques des métaux colloïdaux („Solen“) examinées par Bredig, Müller von Berneck, Ikeda, Reinders, et d'autres, semblent, en plusieurs cas, se rapprocher des enzymes (par l'action d'alcalis, de poisons, etc.) ce qui, à mon avis, n'autorise nullement à faire des identifications entre les deux. Elles diffèrent des actions diastasiques par l'influence qu'exerce sur elles la température. V. Georg Bredig: *Anorganische Fermente*, p. 65, Leipzig 1901. C. Ernst: *Katalyse des Knallgases durch colloïdalen Platin*, *Zeitschr. f. physikal. Chemie* XXXVII, 477 (1901).

moyen de la précipitation par le chlorure stanneux, aussitôt que j'avais reconnu l'importance de ce précipitant pour mes recherches.

Par les essais décrits plus haut (p. 138—39), Kjeldahl avait trouvé que l'optimum pour l'action protéolytique qui se découvre par le sulfate de cuivre, se trouve entre $50^{\circ}.5$ et 55° ; mais à mes premiers essais d'orientation avec la précipitation par l'acide tannique, il paraissait être situé entre 45° et 50° . Comme plus tard, en précipitant par le chlorure stanneux, j'ai eu les plus grands effets plus près des points indiqués par Kjeldahl, il devenait nécessaire, vu la possibilité de l'influence du précipitant employé sur les résultats obtenus, d'examiner, par des essais particuliers, l'action à tous les degrés de température entiers entre 45° et 50° pour les deux précipitants.

On a fait les essais du groupe auquel l'acide tannique était le précipitant au mois de Janvier 1899. On employait un extrait de malt fait d'une partie de malt vert écrasé sur deux parties d'eau distillée, mais dont on n'a pas dosé directement l'azote total. D'après le tableau dressé à la page 159—60, on peut l'évaluer, en toute sûreté, à environ 13^{mg} d'azote par 10^{cc} , parce qu'on y trouvait $6^{\text{gr}}.66$ que l'acide tannique ne précipitait pas. On a fait agir 10^{cc} de cet extrait sur 10^{cc} d'une solution de protéine de froment à 2 p. c. dans de l'acide lactique à 0.4 p. c., pendant deux heures. Comme il était d'importance d'employer le même extrait à tous les essais et que je ne disposais pas d'un nombre d'étuves à température constante suffisant pour faire tous les essais à la fois, j'ai dû les diviser en quatre séries, qui ont été faites, les deux premières, le même jour à une heure d'intervalle, la troisième le lendemain, la quatrième le troisième jour. En attendant, l'extrait de malt, emballé dans de la glace, était placé dans une armoire glacière, à 0° . Pour mieux le conserver, j'ai ajouté du thymol, dont je ne connaissais pas encore l'influence affaiblissante sur le pouvoir fermentatif. Aussi les chiffres des deux dernières séries sont-ils relativement plus bas que ceux des deux premières, mais toutes les courbes vont essentiellement dans le même sens. — Le liquide à essayer était renfermé dans des fioles jaugées de 200^{cc} , placées, pendant deux heures, à des endroits différents:

A la température de 0° dans de l'eau glacée.

- | | | |
|---|---|--|
| — | — | - 5° dans l'armoire glacière. |
| — | — | - 10° dans un rafraîchissoir au sous-sol. |
| — | — | - 15° au laboratoire. |
| — | — | - 25° à l'étuve. |
| — | — | - 30° — 70° dans des bains-marie pourvus de
thermo-régulateurs. |

Pour arrêter les expériences, on ajoutait 10^{cc} d'une solution d'acide tannique à 5 p. c., après avoir refroidi, sous la fontaine, les fioles des températures élevées.

Pour l'appréciation de l'exactitude de mes chiffres, je communique, dans les tableaux ci-dessous de mes résultats par rapport à l'influence de la température, tous les chiffres de mes journaux, c'est à dire, outre les quantités d'azote trouvées, les données des titrages desquelles sont calculées les quantités d'azote¹⁾. Comme, pour les déterminations, on a toujours employé la moitié du filtrat des précipités du tannin et du chlorure stanneux, on a multiplié par 2 le chiffre trouvé de la quantité d'azote, ce qui double les erreurs du titrage.

En rapprochant ces chiffres et, surtout, en les exprimant graphiquement par un système de courbes (v. Pl. I, courbes inférieures),

I^{re} Série, le 27 Janvier 1899, de 11 h. 30 à 1 h. 30.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.	centimètres cubes	centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
Contrôle	(10 ^{cc} de H ² SO ⁴ concentré)	19.54 }	19.54 }	6.66	"
—	(passif)	19.54 }	16.21 }		
131	—	16.18 }	16.21 }		
132	—	16.25 }	16.21	6.66	0.00
133	5°	16.25 }			
134	—	16.18 }			
135	15°	16.00 }	16.00	7.08	0.42
136	—	— }			
137	25°	15.50 }			
138	—	15.50 }	15.50	8.08	1.42
139	35°—37°	14.12 }			
140	—	14.50 }			
141	45°	13.55 }	13.54	12.00	5.34
142	—	13.51 }			
143	50°	13.52 }			
144	—	13.52 }	13.52	12.04	5.38
145	55°	14.46 }			
146	—	14.42 }			
147	60°	15.20 }	15.19	8.70	2.04
148	—	15.18 }			

¹⁾ Plus loin je ne citerai que les chiffres de la quantité d'azote trouvés ainsi.

II^e Série, le 27 Janvier 1899, de 2 h. 40 à 4 h. 40.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.		centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
149	(passif)	16.25 }	16.24	6.60	"
150	—	16.23 }			
151	47°	13.48 }	13.53	12.02	5.42
152	—	13.58 }			
153	49°	13.71 }	13.67	11.74	5.14
154	—	13.63 }			
155	51°	13.77 }	13.80	11.48	4.88
156	—	13.82 }			
157	53°	13.85 }	13.87	11.34	4.74
158	—	13.88 }			

III^e Série, le 28 Janvier 1899, de 2 h. à 4 h.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.		centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
159	(passif)	16.19 }	16.21	6.66	"
160	—	16.22 }			
161	46°	14.02 }	13.96	11.16	4.50
162	—	13.92 }			
163	48°	13.92 }	13.92	11.24	4.58
164	—	13.92 }			
165	52°	14.15 }	14.14	10.80	4.14
166	—	14.13 }			
167	54°	14.46 }	14.58	9.92	3.26
168	—	14.70 }			

IV^e Série, le 30 Janvier 1899, de 11 h. 30 à 1 h. 30.

Expé- riences	Température	Titre	Moyenne	Az du filtrat	Az dédoublé
nos.		centimètres cubes	centimètres cubes	milligrammes	milligrammes
169	(passif)	16.13 }	16.14	6.80	"
170	—	16.15 }			
171	50°	14.25 }	14.18	10.72	3.92
172	—	14.10 }			
173	65°	15.63 }	15.44	8.20	1.40
174	—	15.25 }			
175	70°	16.01 }	16.10	6.88	0.08
176	—	16.18 }			

on trouve que l'optimum est situé à 47° — 48° , le minimum au-dessus de 5° , le maximum à quelque 70° .

Les expériences du second groupe, auquel c'est le chlorure stanneux qui sert de précipitant, ont été faites à la fin d'Avril 1901. L'extrait employé était d'abord préparé de 1000^{gr} de malt vert écrasé et de 1333^{gr} d'eau (3 : 4), donnant 810^{cc} de liquide filtré. Mais pour pouvoir comparer ces expériences aux précédentes, on a dilué l'extrait, de manière à avoir 1 partie de malt pour 2 parties d'eau. Ainsi en 10^{cc}, l'extrait renferme 12^{mg}.52 d'azote total, dont 6^{mg}.20 se sont soustraits à la précipitation par l'acide tannique (Comp. p. 169). Du reste, la marche des essais était la même que celle suivie au premier groupe, si ce n'est que les expériences ne duraient qu'une heure. Des expériences antérieures m'ont appris qu'au bout de deux heures tout l'azote, ou à peu près, d'une solution de protéine à 1 p. c., peut être dédoublé de sorte qu'il se soustrait à la précipitation par le chlorure stanneux. Or, comme il n'y a pas moyen d'obtenir des résultats utiles si la réaction s'achève complètement, ou presque complètement, avant l'expiration de la durée de l'expérience, j'ai préféré de fixer à 1 heure cette durée, d'autant plus que l'entassement des produits de la fermentation pourrait troubler l'expérience. Si alors la relation entre la courbe construite des chiffres trouvés et la courbe de la précipitation par le tannin se déplace un peu dans le sens vertical on a, par compensation, l'avantage de ne pas employer du thymol, mais un extrait de malt tout frais au pouvoir fermentatif non affaibli. Le peu de durée de l'expérience présente l'avantage de vous permettre de terminer tous les essais le jour même. Ceux-ci ont été divisés en trois séries avec une demi-heure, ou une heure, d'intervalle. Ainsi ils ont été terminés tous au courant de 4 heures et demie, période pendant laquelle le pouvoir fermentatif ne peut guère s'être changé. On chauffa d'avance, dans la fiole, la solution de protéine, la mettant dans un bain-marie pendant quelque temps, avant d'y ajouter l'extrait de malt. Celui-ci, au contraire, était, au commencement de l'expérience, à la température ambiante. Il y a là une source d'erreur peu importante mais qui pourra se faire sentir, peut-être, aux températures élevées en diminuant l'action au-dessous de l'optimum et autour de lui, en augmentant l'action au-dessus de l'optimum (ce qui explique le petit trait positif à 70°). — On a arrêté les essais en ajoutant, sans refroidissement préalable, au liquide 5^{cc} de solution de chlorure de calcium à 10 p. c. et 20^{cc} de solution de chlorure stanneux nouvellement préparée. Comme on se servait de fioles jaugées de 50^{cc}, il n'a fallu ajouter que très peu d'eau pour remplir jusqu'au trait.

Le tableau ci-contre montrera les résultats des expériences. Comme

I ^{re} Série				II ^e Série			III ^e Série			I ^{re} + II ^e + III ^e Séries		
Ex-péri-ences	Titre	Az du filtrat		Ex-péri-ences	Titre	Az du filtrat	Ex-péri-ences	Titre	Az du filtrat	Tem-péra-ture	Az du filtrat	Az dé-dou-ble
nos.	centimètres cubes	mg		nos.	centimètres cubes	mg	nos.	centimètres cubes	mg		mg	mg
Con- trôle	19.60	19.60	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1821	13.96	13.64	11.92	"	"	"	"	"	"	(passif)	11.92	0.00
1822	13.32	12.46	14.28	"	"	"	"	"	"	4°	14.28	2.36
1825	—	12.19	14.82	"	"	"	"	"	"	20°	14.82	2.90
1826	12.46	9.15	20.90	"	"	"	"	"	"	35°	20.90	8.98
1827	12.28	7.65	23.90	"	"	"	"	"	"	40°	23.90	11.98
1828	12.10	6.86	25.40	"	"	"	"	"	"	42° 5	25.40	13.48
1829	9.10	6.94	27.28	"	"	"	"	"	"	45°	26.88	14.96
1830	9.20	5.92	29.12	"	"	"	"	"	"	46°	27.28	15.36
1831	7.70	5.04	29.80	"	"	"	"	"	"	47°	28.12	16.20
1832	7.60	4.96	29.80	"	"	"	"	"	"	48°	29.12	17.20
"	"	4.70	29.80	"	"	"	"	"	"	49°	29.80	17.88
"	"	4.70	30.00	"	"	"	"	"	"	50°	30.00	18.08
1833	6.32	4.58	30.14	"	"	"	"	"	"	51°	30.14	18.22
1834	6.00	5.02	29.20	"	"	"	"	"	"	52°	29.78	17.86
"	"	5.22	28.66	"	"	"	"	"	"	53°	29.20	17.28
"	"	5.65	27.92	"	"	"	"	"	"	54°	28.66	16.74
"	"	5.62	27.92	"	"	"	"	"	"	55°	27.92	16.00
1837	5.65	7.80	23.68	"	"	"	"	"	"	57° 5	23.68	11.76
1838	5.62	7.72	21.82	"	"	"	"	"	"	60°	21.82	9.90
1839	8.70	11.22	16.52	"	"	"	"	"	"	65°	16.52	4.60
1840	8.68	13.44	12.64	"	"	"	"	"	"	70°	12.64	0.72
1841	11.22	13.12	12.60	"	"	"	"	"	"	75°	12.60	0.68
1842	11.46	—	13.30	"	"	"	"	"	"			
"	"	—	13.30	"	"	"	"	"	"			
"	"	—	13.30	"	"	"	"	"	"			
"	"	—	13.30	"	"	"	"	"	"			

Az total de 10^{cc} d'extrait de malt..... 12^{mg}.52

— — de solution de protéine..... 30^{mg}.60

Az total de 20^{cc}..... 43^{mg}.12

Ce jour-là la température de l'armoire glacière était de 4°, celle du laboratoire de 20°.

le tableau précédent, il donne tous les chiffres de mon journal. Si on relie les chiffres trouvés dans une courbe qu'on inscrit sur la planche de la courbe établie pour la précipitation par l'acide tannique, quoique les deux ne soient pas commensurables sur tous les points, plusieurs faits sauteront aux yeux.

D'abord, l'action que constate la précipitation par le tannin est, quantitativement, beaucoup moins étendue que celle sur laquelle nous éclaire la précipitation par le chlorure stanneux. Puis, la courbe de l'acide tannique n'a pas d'optimum bien défini. L'accroissement de 35° à 47° — 48° n'est pas très fort; il y a plutôt, à ce qu'il paraît, une zone optima entre 45° et 50° . De là le décroissement vers 70° , le maximum, est aussi très uniforme, mais à cette température l'activité s'arrête complètement. Remarquons, pourtant, que l'action à 60° est bien plus basse qu'à 35° , tandis qu'à la précipitation par le chlorure stanneux la tendance est dans le sens inverse, l'action étant un peu plus intense à 60° qu'à 35° . Ce n'est qu'au-delà de 5° que l'action est perceptible, mais elle est très faible encore à 15° , à peine $0^{\text{mg}}.5$ d'azote dédoublé.

La courbe du chlorure stanneux, au contraire, a un point optimum à 51° , avec accroissement rapide avant ce point et avec décroissement plus rapide encore après lui. A 35° et à 60° l'action est, à peu près, la même, mais la moitié seulement de ce qu'elle est à 51° . Rien ne se passe à 70° et 75° : l'enzyme est détruite. Les petits traits positifs de $0^{\text{mg}}.72$ et $0^{\text{mg}}.68$ respectivement d'azote dédoublé peuvent, nous l'avons dit, s'expliquer par la température de l'extrait de malt au moment où, au commencement de l'expérience, on l'a ajouté à la solution de protéine chaude: c'était à la température ambiante que le mélange a eu lieu, et il a fallu quelques minutes pour qu'elle s'élève à 70° et à 75° . Il faut donc supposer que le mélange a été, pendant un moment, à la température optima, ce qui a donné à l'enzyme l'occasion d'agir. Ce qui se passe aux températures basses est particulièrement digne d'attention; avant tout, la force de l'action à 4° . J'aurais cru à une erreur grave si plusieurs autres séries d'expériences n'avaient donné des résultats identiques¹⁾. Cependant, le peu de différence entre les actions à 4° et à 20° s'explique, pour ce groupe d'essais, en partie, par une erreur expérimentale, et le chiffre de 4° est un peu trop élevé. En effet, je n'avais pas,

¹⁾ Ainsi dans deux séries d'expériences le dédoublement de l'azote était dans l'une à 4° : $5^{\text{mg}}.34$, à 20° : $13^{\text{mg}}.06$; dans l'autre à 4° : $6^{\text{mg}}.18$, à 20° : $13^{\text{mg}}.52$. Les essais duraient 3 heures. A cette durée assez longue les effets sont si grands et s'accordent si bien entre eux qu'il n'y a pas moyen de s'y tromper.

avant d'opérer le mélange de l'extrait de malt et de la solution de protéine, pris soin de les refroidir séparément. Les mélangeant à la température ambiante, je les ai mis dans l'armoire glacière. La plus grande partie de la surface de la fiole n'y étant en contact qu'avec l'air, sans être plongée dans un liquide froid, le refroidissement s'est fait moins vite, et ce n'est peut-être que vers la fin de la durée brève de l'expérience qu'il a atteint 4°¹).

Plus tard, en parlant des résultats obtenus au moyen d'un certain nombre d'autres précipitants: chlorure mercurique, sulphate de zinc, acétate uranique, acide phosphotungstique, et au moyen de dosages

- ¹) Les effets plus grands de la durée plus longue (3 heures), comparés à ceux de la durée plus brève, prouvent que l'action continue après le refroidissement. — Il faut, cependant, ne pas oublier un fait sur lequel j'ai déjà attiré l'attention p. 162: si on précipite séparément, par du chlorure stanneux, un extrait de malt et une solution de protéine la quantité totale précipitée est plus grande que celle d'un mélange des deux, quand même la précipitation se fait immédiatement après le mélange. Ceci indique peut-être que l'action de la peptase est très rapide donnant, pour ainsi dire, des effets notables instantanément, et il s'ensuit des essais cités qu'elle est assez énergique à des températures relativement basses. Des séries d'expériences postérieures viennent confirmer ces conclusions. Je citerai des chiffres: dans des essais faits à la température optima de 51°, il y avait:

au bout de 15 minutes	12.86	milligrammes d'Az	dédouble
- — - 30 —	18.22	—	—
- — - 45 —	22.98	—	—
- — - 1 heure	25.10	—	—
- — - 2 heures	28.34	—	—
- — - 3 —	28.74	—	—
- — - 4 —	28.70	—	—

Dans d'autres essais, faits à 20°, il y avait:

au bout de 1/2 heure	2.08	milligrammes d'Az	dédouble
- — - 1 —	5.44	—	—
- — - 2 heures	8.32	—	—
- — - 4 —	15.88	—	—

Dans cette dernière série, le chiffre d'une demi-heure est peut-être un peu trop bas par suite d'une erreur expérimentale. Mais comme ces chiffres ont été obtenus en multipliant par 4, parce que, par exception, on n'y employait que 5^{cc} d'extrait de malt + 5^{cc} de solution de protéine, l'erreur a été quadruplée. Cependant, tout compté, on voit qu'aux températures plus élevées il faut compter avec une action presque instantanée et que l'action de la peptase dans le sens indiqué est assez énergique déjà à 4°. Il serait intéressant d'apprendre si elle existe aussi à 0° et au-dessous; mais je n'ai pas encore fait d'expériences à ce sujet.

d'ammoniaque par distillation avec la magnésie, je vais discuter en détail les actions chimiques qui sont exprimées par les courbes de la Pl. I. Rappelons ici que le chlorure stanneux ne précipite, à ce qu'il faut croire, que les matières albuminoïdes proprement dites et non dédoublées, tandis que l'acide tannique précipite aussi les albumoses et les peptones.

Il serait d'un grand intérêt, sans doute, de déterminer aussi les courbes de température des autres précipitants que je viens de nommer. C'est aussi ce que j'ai essayé en faisant des séries d'essais à des températures différentes: 4° , 19° , 31° , 33° , 47° , 60° . Ces essais, cependant, on les a faits avant de se douter qu'on avait affaire à un dédoublement d'une rapidité et d'une intensité telles que révélaient, plus tard, les essais avec le chlorure stanneux¹⁾, ou que les différentes phases du phénomène avaient des optima de température différents. Aussi, pour obtenir des traits bien prononcés, étendais-je toujours la durée jusqu'à 3 heures, et suis-je descendu bien au-dessous du point le plus favorable à une des fonctions²⁾, au moins, en supposant que 47° était l'optimum commun. Il est évident que la relation des courbes de précipitation a été troublée, de sorte qu'elles ont perdu une grande partie de leur valeur en tant que courbes de température. Aussi ces essais présentent-ils un plus grand intérêt dans une autre connection (v. plus loin, IV, 4). —

Reste à comparer mes résultats avec ceux de mes devanciers qui ont traité la question de la température. Windisch et Schellhorn³⁾ ont fait des essais d'autodigestion. Ils se servent surtout d'extraits de malt touraillé et clair, finement moulu, mais aussi de malt vert écrasé, dont les plumules sont longues de $\frac{2}{3}$ à $\frac{3}{4}$ de la longueur du grain. On digère le malt avec des quantités d'eau différentes pendant un temps de 5 quarts d'heure à 3 heures. Les températures des essais sont: 5° — 7° , 11° — 15° , 22° — 24° , 37° , 42° , 50° , 52° . Dans la même série d'expériences, on n'applique jamais plus de cinq températures différentes. Les essais durent de 20 à 24 heures, après l'addition de chloroforme, à titre d'antiseptique. On poursuit la marche

¹⁾ Presque toutes les indications de la littérature à ce sujet sont les résultats d'essais prolongés, durant des jours ou des mois, tant pour les enzymes protéolytiques végétales que pour les animales.

²⁾ Rappelons ici qu'à la courbe de chlorure stanneux de la Pl. I l'effet est plus faible à 47° qu'à 51° de 2^{mg}, quoique, dans ce cas, l'extrait de malt fût de beaucoup plus faible que celui de ces essais, et que la durée ne fût que d'une heure.

³⁾ Windisch und Schellhorn: Wochenschr. f. Brauerei XVII, 409 ss. (1900).

de l'action en déterminant: 1° l'albumine coagulable, en faisant bouillir pendant 2 minutes; 2° les albumoses, en précipitant le filtrat des albumines par du sulfate de zinc; 3° les soi-disant peptones¹⁾, en précipitant par l'acide phosphotungstique le filtrat de la précipitation par le sulfate de zinc. 4° le soi-disant azote amidé, en faisant bouillir avec de l'acide chlorhydrique²⁾, pendant une heure, le filtrat des albumines, et en distillant l'ammoniaque. Que les résultats des deux dernières opérations soient extrêmement vagues, cela saute aux yeux.

— Les tableaux des auteurs font voir distinctement le décroissement tant des matières albuminoïdes que des albumoses (qu'on note bien la longue durée des expériences) avec l'accroissement de la température jusqu'à une certaine limite. C'est là un fait qui constitue aussi une des conclusions de leurs essais, malgré le peu d'exactitude de leurs déterminations et leurs erreurs graves, qui causent quelquefois des variations singulières au-dedans des températures auxquelles on pourrait s'attendre à un accroissement continu. Mais voilà la seule conclusion qu'ils soient en droit de tirer. Ils croient encore avoir trouvé „dass die Abbauprodukte, besonders wenn man das Enzym bei niedriger Temperatur wirken lässt, sehr weitgehend sind“. Ils relèvent même ceci comme le résultat principal de leurs essais. Mais toute personne qui examine leur étude, verra du coup que l'essai justement (essai 13) sur lequel ils fondent cette conclusion, invite à la plus grande circonspection, faisant soupçonner des erreurs graves aux déterminations de la „Zunahme der Peptone“. Il y a bien quelque chose de vrai à cette proposition dans sa généralité. Mais ils sont, sans doute, loin de la réalité en pensant que c'est surtout à 12° et autour de cette température (à 5° ils ont une indication en sens inverse) que les „soi-disant peptones“ se dédoublent ultérieurement.

Fernbach et Hubert³⁾ ont, de même, fait des expériences d'autodigestion avec un extrait de malt touraillé, stérilisé par filtration à la bougie Chamberland. Ils ont réussi à rendre incoagulables 45 p. c. des matières albuminoïdes primitivement coagulables. Ils disent entre autres choses: „Dans les conditions du brassage, la solubilisation de l'azote par la diastase protéolytique est déjà active à la température de 40°; la température optima est voisine de 60°, mais l'activité est encore considérable à 70°.“ Ces indications paraissent s'écarter un peu de mes résultats. Je doute aussi que l'optimum soit si haut. Peut-être n'ont-ils pas un assez grand nombre de températures pour

¹⁾ Expression des auteurs.

²⁾ Ils n'en indiquent pas la force.

³⁾ Fernbach et Hubert: C. r. CXXX, 1783—85 (²⁵/₆ 1900).

pouvoir déterminer, avec assez d'exactitude, ce point. Leur communication ne permet pas d'en juger. Mais quant à l'activité plus grande qu'ils ont trouvée à 70°, il est possible que l'enzyme du malt touraillé soit plus résistante aux températures élevées que celle du malt vert. De plus, d'après ces auteurs, les produits diffèrent selon la température. En se servant de l'acide phosphotungstique pour séparer l'azote peptonisé de l'azote amidé, ils trouvent qu'à „40° la totalité de l'azote appartient à des composés amidés non précipitables au réactif mentionné; à 60° l'azote amidé ne constitue plus que 50 p. c. à 60 p. c. de l'azote solubilisé, et, à 70°, à peine 40 p. c.“ Ce résultat, suivant lequel le dédoublement est le plus profond aux températures relativement basses, et auquel sont arrivés aussi Windisch et Schellhorn, s'accorde essentiellement avec les miens. Là aussi, il faut se rappeler, cependant, qu'ils ont tous prolongé leurs expériences pendant un temps très long, pendant lequel les albumoses formées d'abord ont été, peu à peu, dédoublées à leur tour, l'action trypsique, suivant mes essais, étant presque tout aussi énergique à 35° qu'à 47°, tandis qu'elle est très faible à 60°. La formation des albumoses, au contraire, atteint, à l'optimum, son plus haut point de développement au bout de très peu de temps, 2—3 heures, se produisant encore énergiquement à 60°.

Petit et Labourasse¹⁾ ont fait des expériences de brassage avec du malt „faiblement touraillé“, qu'ils ont digéré avec de l'eau distillée pendant 2 heures à des températures différentes.

Ils trouvent le maximum de matières dissoutes à 55°, tandis que la formation des albumoses et des corps amidés paraît être le plus grande à 40°—45°.

Il est impossible de tirer des conclusions sur la dépendance de la température des différentes phases des enzymes protéolytiques ou de la protéolyse au moyen d'essais comme ceux que nous venons de nommer. Les conditions des expériences sont trop compliquées. Les conditions d'extraction y interviennent. La coagulation des matières protéiques, qui commence déjà à des températures relativement basses, est une cause perturbatrice. Le manque de réactifs propres à séparer les différents produits de dédoublement se fait sentir davantage. Les chiffres obtenus sont tous des chiffres de proportions et qui ne permettent pas de calculer les mesures absolues du pouvoir fermentatif.

Je laisserai aussi de côté les essais de brassage assez nombreux, à des températures différentes, que j'ai faits moi-même. Je renvoie, à

¹⁾ Petit et Labourasse: C. r. CXXXI, 349—51 (80/7 1900).

ce sujet, partie à ce que j'ai publié autrefois¹), partie à une étude qui paraîtra plus tard dans ces Comptes rendu et dans laquelle on traitera à part ces essais et une série d'essais nouveaux.

Si donc les résultats auxquels sont arrivés les auteurs nommés, diffèrent des miens à certains égards, il n'y faut attacher aucune importance. En réalité, des essais avec un extrait de malt vert agissant sur une matière protéique ajoutée, sont incommensurables à des essais d'autodigestion avec un extrait de malt touraillé, ou à des essais de brassage avec le malt torréfié à la touraille. Peut-être que les enzymes, après une première torréfaction, pourront agir aussi plus tard, à une température plus élevée (Fernbach et Hubert) que lorsqu'on les extrait directement des grains frais en germination²); mais les communications brèves des savants français ne permettent pas de contrôler leurs expériences, et, en dehors des différences déjà nommées entre leur méthode et la mienne, il peut y en avoir eu d'autres qui auront exercé une influence décisive sur les résultats.

Voici, à peu près, le résumé des conclusions auxquelles m'ont conduit mes expériences à l'égard de la dépendance de la température du pouvoir fermentatif protéolytique d'un extrait de malt vert, en tout cas pour la protéolyse de la protéine de froment:

1° La première phase de la protéolyse, le dédoublement en albumoses, s'opère avec des effets assez vigoureux déjà à des températures relativement basses (4°, 20°); avec rapidité et intensité à 51°, température qui forme un optimum prononcé et auquel l'effet est presque deux fois aussi énergique qu'à 35° et à 60°. Le minimum est au-dessous de 4°; le maximum est à 70°, ou au-dessous.

2° Le dédoublement plus profond, la transformation des albumoses en produits non précipitables au tannin, s'opère beaucoup plus lentement que le dédoublement en albumoses. Il a son optimum entre 45° et 50° (à 47° — 48° probablement), mais, sur ce parcours, la courbe est parallèle, à peu près, à l'axe des abscisses. A 35°, l'effet n'est qu'un peu plus faible qu'à 47°, mais à 60°, il est beaucoup plus faible, ayant cessé entièrement à 70°. Après deux heures, l'effet est nul à 5°, et extrêmement faible à 15°.

¹) Fr. Weis: Ueber das proteolytische und ein eiweisskoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz). Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI. 79—97 (1900).

²) Kjeldahl (v. p. 139) qui a aussi, tant qu'on peut comprendre de son journal, opéré avec des extraits de malt touraillé, a trouvé de même, nous l'avons vu, des effets notables à 70°.

2. Dépendance de la quantité de ferment.

Il est impossible de faire des recherches absolument exactes de l'influence de cet agent, tant qu'on ne pourra produire l'enzyme à l'état pur, sans parler des cas où on ne peut la produire à l'état solide sans affaiblir considérablement le pouvoir fermentatif, mais où il faut opérer avec des extraits contenant nombre d'autres matières. En effet, aussitôt qu'on y fait varier la quantité de ferment, on fait varier, en même temps, beaucoup d'autres facteurs. Dans un cas comme le présent, où l'extrait de malt contient des quantités considérables de matières protéiques, partie restées intactes, partie dédoublées par les enzymes protéolytiques, un facteur tel que la concentration des matières albuminoïdes variera avec la quantité de ferment. Et même s'il y a moyen, comme nous le ferons voir plus loin, d'éliminer approximativement cette cause perturbatrice, d'autres facteurs, par exemple la teneur variée en phosphates du liquide à essayer qu'on additionne aussi avec l'extrait de malt, pourront modifier la marche de la protéolyse.

On ne pourra donc pas tirer des conclusions particulièrement importantes des essais suivants de l'influence de la quantité de ferment sur la protéolyse, d'autant plus qu'ils présentent des défauts étrangers aux circonstances dont nous venons de parler. Cependant, des recherches de ce genre sont indispensables à la connaissance exacte de cette protéolyse et des enzymes qui en sont la cause. Je soumettrai donc ceux de mes essais qui y visent.

Je ne me suis servi du chlorure stanneux comme précipitant qu'à une seule série d'essais, employant aux autres l'acide tannique. Aussi les résultats portent-ils sur la phase trypsique de la protéolyse principalement.

Voici comment j'ai opéré aux essais faits en employant l'acide tannique: Pour porter la relation entre les 10^{cc} ordinaires de solution de protéine et les 10^{cc} d'extrait de malt au-delà de cette dernière quantité, sans changer la concentration de protéine et d'acide lactique du liquide, on part de solutions de protéine plus concentrées que les solutions ordinaires à 2 p. c. A cette fin, on a fait une solution de 5 p. c. de protéine dans de l'acide lactique aqueux à 1 p. c. A la 1^{re} série d'essais on en emploie 10^{cc}, que, par l'additionnement de quantités variées d'infusion de malt (0, 5, 10, 15 ... 40^{cc}) et d'eau distillée, on porte toujours au volume total de 50^{cc} contenant 1 p. c. de protéine et 0.2 p. c. d'acide lactique. A la II^e série on a, par suite de circonstances particulières (v. plus loin), opéré avec une solution de protéine un peu plus faible; mais dans celle-ci, et à la III^e série, je suis parti d'une solution de protéine de 15^{cc} à 5 p. c., et le volume a été complété, comme tout à l'heure, mais à 75^{cc}. Pour comparer les

résultats obtenus avec d'autres, les chiffres des tableaux suivants sont réduits aux 20^{cc} ordinaires de liquide à essayer contenant 1 p. c. de protéine et 0.2 p. c. d'acide lactique (à l'exception de la II^e série). — En même temps, on a fait des essais d'autodigestion avec les mêmes extraits, étendus d'eau au même volume, en ajoutant de l'acide lactique en quantité correspondante. En soustrayant les chiffres obtenus ainsi de l'azote dédoublé total on détermine l'azote dû au dédoublement de la protéine. Comme, naturellement, les diverses quantités d'extraits de malt présenteront, à très peu de chose près, le même rapport entre l'azote total et l'azote non précipité et que, pendant la même durée, l'azote dédoublé sera presque le même, fait que m'ont appris un grand nombre d'essais d'autodigestion, les tableaux pourront servir non seulement à calculer l'étendue de l'autodigestion de tous les extraits employés, mais on sera en droit d'appliquer les mêmes valeurs à des séries d'essai auxquelles n'est entré aucun essai d'autodigestion.

Les essais ont été faits à 47°; ils ont duré 2 heures.

I^{ère} Série (Essais nos. 379—414). L'extrait contient, en 10^{cc}, 16^{mg}.35 d'azote, dont 8^{mg}.88 non précipitable par l'acide tannique. La protéine, calculée à 0^{gr}.2, correspondant à 10^{cc} d'une solution à 2 p. c., contient 30^{mg}.42 d'Az. L'azote total du liquide varie d'après la quantité de l'extrait, ainsi que fait voir la deuxième colonne du tableau.

I^{ère} Série.

30 ^{mg} .42 d'Az de protéine				Az total	Az du filtrat		Az dédoublé		
					pour com- mencer	au bout de 2 heures	total	de l'extrait	de la pro- téine
cc		mg		mg	mg	mg	mg	mg	mg
0 d'extrait contenant 0.00 d'Az...				30.42	0.08	0.08	—	—	—
2 — — 3.27 — ...				33.69	1.80	2.97	1.17	(0.47)	(0.70)
4 — — 6.54 — ...				36.96	3.60	6.58	2.98	1.02	1.96
6 — — 9.81 — ...				40.23	5.40	10.98	5.58	(1.41)	(4.17)
8 — — 13.08 — ...				43.50	7.20	14.26	7.06	1.81	5.25
10 — — 16.35 — ...				46.77	9.00	18.18	9.18	(2.35)	(6.83)
16 ¹⁾ — — 26.16 — ...				56.58	14.40	26.26	11.86	3.75 ²⁾	8.11

II^e Série (Essais nos. 415—438). L'extrait contient, en 10^{cc}, 17^{mg}.21 d'azote, dont 9^{mg}.56 non précipitable par l'acide tannique. La solution de protéine est la même qu'à la série précédente, mais, pour en avoir

¹⁾ Les essais avec 12^{cc} et 14^{cc} d'extrait ont échoué.

²⁾ D'après les trois déterminations de 4^{cc}, 8^{cc}, 16^{cc} d'extrait en 2^{cc}, l'autodigestion fera 0^{mg}.47 environ, dont on a calculé les chiffres entre parenthèses. On s'est servi d'un calcul semblable aux tableaux suivants.

assez, on a étendu 275^{cc} à 5 p. c. à 310^{cc}. Ainsi le liquide à essayer, réduit à 20^{cc}, ne contient que 23^{mg}.84 d'azote de protéine. Après l'ébullition, on ajoute du thymol à la solution de protéine. Ceci, ajouté à la concentration relativement plus faible, a fait que, malgré la quantité plus grande d'azote, l'action de cet extrait est un peu moins énergique que l'action de l'extrait de la série précédente.

III^e Série (Essais nos. 623—646). On ne fait pas de dosage de l'azote total de l'extrait de malt. En 10^{cc} d'extrait, 10^{mg}.00 d'azote se sont soustraits à la précipitation par l'acide tannique. On ne fait pas de dosage non plus de l'azote de la solution de protéine. Mais je suis partie d'une solution à 5 p. c. Par conséquent, dans le liquide à essayer réduit (20^{cc}) il y aura environ 30^{mg}.00 d'azote-protéine = 1 p. c. de protéine; à cette série les effets étaient beaucoup plus vigoureux qu'aux séries précédentes.

II^e Série.

23 ^{mg} .84 d'Az-protéine		Az total	Az du filtrat		Az dédoublé		
			pour com- mencer	au bout de 2 heures	total	de l'extrait	de la pro- téine
cc	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
6.6 d'extrait contenant	11.35 d'Az..	35.19	6.56	11.66	5.10	1.51	3.59
8.0 — —	13.76 — ..	37.60	7.82	14.71	6.89	(1.84)	(5.05)
9.3 — —	16.00 — ..	39.84	9.09	16.90	7.81	(2.13)	(5.68)
10.6 — —	18.23 — ..	42.07	10.36	18.90	8.54	(2.43)	(6.11)
12.0 — —	20.64 — ..	44.48	11.62	20.71	9.09	(2.76)	(6.33)
13.3 — —	22.88 — ..	46.72	12.89	22.49	9.60	3.06	6.54
14.6 — —	25.11 — ..	48.95	14.16	24.27	10.11	(3.36)	(6.75)
16.0 — —	27.52 — ..	51.36	15.42	26.28	10.86	(3.69) ¹⁾	(7.17)

III^e Série.

0 ^{gr} .2 de protéine		Az du filtrat		Az dédoublé		
		pour com- mencer	au bout de 2 heures	total	de l'extrait	de la pro- téine
cc		mg	mg	mg	mg	mg
0.0 d'extrait de malt.....		0.02	0.02	—	—	—
2.6 — —		2.67	5.42	2.75	(0.61)	(2.14)
5.3 — —		5.34	12.10	6.76	(1.24)	(5.52)
8.0 — —		8.01	18.03	10.02	(1.88)	(8.14)
10.6 — —		10.68	23.16	12.48	(2.47)	(10.01)
13.3 — —		13.35	27.95	14.60	(3.12)	(11.48)
16.0 — —		16.02	30.77	14.75	(3.75) ¹⁾	(11.00)

¹⁾ V. note 2 p. 182.

On ajoute, à titre de comparaison, une série d'essais où le chlorure stanneux a servi de précipitant:

IV^e Série (Essais nos. 1919—1930, 1936—1940). A ces essais l'extrait de malt contient, en 10^{cc}, 18^{mg}.54 d'azote total, dont 12^{mg}.42 imprécipitable par le chlorure stanneux. On emploie partout 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c., contenant 31^{mg}.74 d'azote. On varie avec des extraits de malt de 0^{cc} à 10^{cc}; là où le volume de l'extrait employé est au-dessous de 10^{cc}, on étend d'eau de manière à porter toujours le volume du liquide à essayer à 20^{cc}. On ne fait aucun essai d'autodigestion avec de l'extrait de malt seul¹⁾. La température est de 51°; la durée est de 2 heures.

IV^e Série.

31 ^{mg} .74 d'Az-protéine		Az total	Az du filtrat		Az dédoublé	
			pour com- mencer	au bout de 2 heures	total	de la protéine seule ²
cc	mg	mg	mg	mg	mg	mg
0 d'extrait de malt contenant 0.00 d'Az. .		31.74	1.64	1.64	0.00	—
2 — — — 3.71 — ..		35.45	4.12	10.84	6.72	(6.20)
4 — — — 7.40 — ..		39.14	6.60	22.04	15.44	(14.40)
6 — — — 11.10 — ..		41.84	9.08	32.56	23.48	(21.92)
8 — — — 14.80 — ..		46.54	11.56	38.84	27.28	(25.20)
10 — — — 18.54 — ..		50.28	14.06	43.28	29.22	(26.62)

Les résultats de ces séries sont exprimés graphiquement sur la planche II. Les deux courbes supérieures, dont l'une pleine et l'autre ponctuée, indiquent la quantité d'azote qui s'est soustraite, pendant le temps d'expérience appliqué, à la précipitation par le chlorure stanneux, toutes les autres indiquant, pareillement, la précipitation par l'acide tannique. La courbe la plus basse exprime l'autodigestion dans un des extraits de malt employés, l'acide tannique servant de précipitant. Les autres courbes pleines indiquent la quantité totale d'azote dédoublé de la solution de protéine + l'extrait de malt, tandis que les

¹⁾ Voici, à titre de comparaison, quelques données d'une autre série d'expériences. L'extrait de malt y contenait, en 10^{cc}, 19^{mg}.10 d'azote et 12^{mg}.70 d'azote imprécipitable par le chlorure stanneux. Après 3 heures d'autodigestion à 47°, 15^{mg}.24 d'azote sont restés imprécipitables par le chlorure stanneux; après 5 heures 15^{mg}.44 d'azote. Donc, dans ces espaces de temps, il y avait en 2^{mg}.54 et 2^{mg}.74 d'azote de dédoublés; par conséquent, 3^{mg}.86 et 3^{mg}.66 d'azote restaient sans dédoublement.

²⁾ Calculé d'après la valeur de l'autodigestion (pour 10^{cc}, 2^{mg}.6), indiquée à la note précédente.

deux courbes ponctuées montrent la quantité de protéine seule, dédoublée aux séries I et IV.

Il va sans dire que les courbes qui indiquent la quantité totale d'azote dédoublé, s'élèvent forcément avec la quantité d'extrait de malt, mais on pourrait, sans doute, se figurer que le dédoublement de protéine ne croîtrait pas, avec la quantité croissante de ferment, au-delà d'une certaine limite.

3. Dépendance de la concentration de la solution de protéine.

En faisant des expériences d'orientation pour reconnaître les meilleures conditions (température, durée, acidité, etc.) donnant les résultats relativement les plus grands, il est d'importance de choisir une concentration convenable de l'albumine (dans mon cas la protéine de froment) soumise à l'action de l'extrait de malt. Cette concentration doit satisfaire aux conditions suivantes: elle ne doit pas entraver l'action des enzymes; elle doit donner des indications notables pour de petites variations aux conditions des expériences sans que, cependant, la réaction finisse au-dedans de la durée ordinaire d'expérience; enfin, elle doit se prêter, sans grandes difficultés, aux dosages d'azote auxquels, on le sait, il est préférable que la matière, soumise à l'examen, ne contienne pas des quantités trop grandes d'azote. Une solution qui se montre très convenable au-dedans de la durée de 2 heures des expériences modèles est celle, à 2 p. c. de protéine, dont 10^{cc} contiennent environ 30^{mg} d'azote, et qui, additionnée de son volume d'extrait de malt, donne une concentration de 1 p. c. de protéine. Elle s'est montrée satisfaisante surtout tant que je n'ai employé, comme précipitant, que l'acide tannique, n'examinant ainsi que la phase profonde de la protéolyse (action de la tryptase).

Le choix de cette concentration s'appuie aussi sur les essais que nous allons décrire ci-dessous. On y emploie des solutions qui, additionnées d'extrait de malt, donnent des concentrations de protéine à $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5 p. c. On y détermine aussi, pour les concentrations diverses, la quantité tant absolue que pour 100 d'azote-protéine imprécipitable par le tannin au bout de 2 ou de 5 heures de l'action de l'extrait de malt.

Aux trois séries d'essais A (nos. 717—736), B (nos. 737—752), C (nos. 753—774), on a employé trois extraits de malt différents. A aucun d'eux on n'a dosé l'azote total; mais 10^{cc} en contenaient au filtrat du précipité par le tannin 9^{mg}.84, 9^{mg}.74, 8^{mg}.64 d'azote respectivement. On a fait toutes les différentes concentrations de protéine de la même solution de protéine à 10 p. c. et de laquelle 1^{cc} contenait 15^{mg}.09 d'azote. Pour déterminer la quantité de protéine

1 p. c. de protéine = 30 ^{mg} .18 d'azote- protéine	A nos. 717—736 Az dédoublé au bout de 2 heures à 47°			B nos. 737—752 Az dédoublé au bout de 2 heures à 47°			C nos. 753—774 Az dédoublé au bout de 5 heures à 47°		
	total	de la pro- téine	pour 100 d'Az- pro- téine	total	de la pro- téine	pour 100 d'Az- pro- téine	total	de la pro- téine	pour 100 d'Az- pro- téine
0.00 p. c. de protéine ...	2.76	0.00	0.00	2.76	0.00	0.00	3.04	0.00	0.00
0.25 - = 7 ^{mg} .55 d'Az	4.64	1.88	24.9	—	—	—	6.46	3.42	45.3
0.50 - = 15 ^{mg} .09 —	6.28	3.52	23.3	—	—	—	9.60	6.56	43.5
1.00 - = 30 ^{mg} .18 —	9.24	6.48	21.5	9.36	6.60	21.9	13.96	10.92	36.2
2.00 - = 60 ^{mg} .36 —	12.20	9.44	15.6	13.00	10.24	17.0	18.66	15.62	25.9
3.00 - = 90 ^{mg} .54 —	15.74	12.98	14.3	14.58	11.82	13.1	21.38	18.34	20.3
4.00 - = 120 ^{mg} .72 —	15.30	12.54	10.4	13.80	11.04	9.1	22.32	19.28	16.0
5.00 - = 150 ^{mg} .90 —	15.48	12.72	8.4	14.68	11.92	7.9	22.96	19.92	13.2

échappant peu à peu à la précipitation par le tannin, on a fait des essais avec des extraits de malt seuls, additionnés d'eau acidulée d'acide lactique. Les résultats des trois séries d'essais sont donnés au tableau suivant et à la planche III *a* et *b*.

On voit qu'aux concentrations basses la quantité de protéine dédoublée est le moins grande, prise absolument, mais le plus grande pour 100 de protéine. A tous les essais, le maximum d'effet est atteint s'il y a 3—4 p. c. de protéine, c.-à-d. le dédoublement d'azote-protéine est, dans ce cas, aussi grand qu'aux concentrations plus élevées (5 p. c.), ou à partir de ce point les courbes passent, au-dedans d'une durée fixe (2 ou 5 heures), presque parallèlement à l'axe des abscisses. Mais pour 100 de protéine l'effet n'y est que moitié aussi grand qu'à 1 p. c. En choisissant cette concentration aux expériences modèles, on économise considérablement la protéine, dont la production demande beaucoup de temps et un grand travail.

A d'autres essais, qui ne seront communiqués que plus loin (p. 189; Pl. IX, X) parce qu'on y examine aussi l'influence de la durée de l'essai à des concentrations diverses de protéine (1, 2¹/₂, 5 p. c.), on précipitait à la fois par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On pourrait, sans doute, détacher les résultats de ces essais pour l'action des durées de 2 et de 5 heures en les comparant à ceux dont je viens de parler, mais je me contenterai de renvoyer à cette partie, tant au tableau qu'aux conclusions que je tire de ces essais (v. III, 7).

4. Dépendance du temps.

Il va de soi qu'à toute action de ferment il faut prendre en considération le temps en déterminant l'influence des autres facteurs. En

mesurant le pouvoir fermentatif et en déterminant l'intensité d'une fermentation, on fait toujours, naturellement, comme à la mesure de tout travail mécanique, entrer le temps en la définition.

Le temps que demandent les enzymes diverses pour finir la réaction qui les caractérise, ou pour la mener au point auquel les conditions de l'essai lui permettent d'atteindre, varie beaucoup. Il dépend d'agents tels que température, quantité de ferments, nature et concentration des matières en fermentation, réaction du liquide à essayer, présence de matières étrangères, etc. Mais, du reste, en présence des conditions les plus favorables, on voit, par exemple, que la présure achève sa réaction caractéristique presque instantanément, ou au bout de quelques minutes; que l'amylase atteint son maximum au bout de $\frac{1}{2}$ à 1 heure, tandis que l'invertase pourra continuer d'agir pendant des heures, voir même des jours, et que d'autres enzymes, entre autres des enzymes protéolytiques, continueront pendant des mois. On a, sans doute, considéré ces dernières, notamment les enzymes trypsiques, comme assez lentes dans leur action. Aussi plusieurs entre ceux (Green, Butkewitsch, Windisch et Schellhorn) qui ont opéré avec des enzymes protéolytiques végétales, se sont-ils servis, de préférence, de temps d'essai longs. Je démontrerai que la conséquence en a été que les premières phases de la protéolyse, par exemple la formation d'albumose, leur ont échappé; aussi n'a-t-on pas bien saisi la vitesse et l'intensité avec lesquelles pourra s'achever la protéolyse.

Pendant la première partie de mon travail — tant que je me servais du tannin comme seul précipitant — j'avais l'esprit prévenu, pensant que la dépendance du temps de la protéolyse s'exprimerait par une courbe qui aurait atteint, au bout de quelques heures, son maximum et qui, après, passerait parallèlement à l'axe des abscisses. Mais mes premières expériences n'ayant pas confirmé cette supposition, j'étais disposé à voir dans ce fait l'influence perturbatrice d'autres agents (des bactéries, par exemple). J'ai donc répété ces expériences de temps à autre, variant toujours quelque peu les conditions; ainsi j'ai additionné du thymol pour exclure les bactéries. Mais toutes les séries d'essais ont donné, essentiellement, le même résultat: la croissance continue de la courbe, en tout cas, jusqu'à et au-delà de vingt-quatre heures de temps d'essai. J'ai fait ainsi un plus grand nombre d'essais qu'il n'était strictement nécessaire pour la détermination de la courbe de temps de la phase trypsique de la protéolyse; mais comme ils se confirment tous, je les citerai.

On trouvera les résultats au tableau ci-contre (v. aussi Pl. IV). Voici quelques notions sur les conditions:

Précipitation par l'acide tannique.

Heures	I ^e Série 50°		II ^e Série 50°		III ^e Série 47° (du thymol après 5 heures)		IV ^e Série 47°	
	Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dé- double
au bout de	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
0	5.23	"	6.39	"	10.72	"	7.10	"
1/2	6.71	1.48	"	"	13.86	3.14	"	"
1	8.34	3.11	"	"	16.52	5.80	12.44	5.34
1 1/2	8.68	3.45	"	"	17.86	7.14	"	"
2	"	"	11.97	5.58	19.26	8.54	15.52	8.42
2 1/2	"	"	"	"	21.06	10.34	"	"
3	11.17	5.94	13.24	6.85	(22.72)	(12.00)	16.92	9.82
3 1/2	"	"	"	"	"	"	18.10	11.00
4	"	"	14.24	7.85	22.06	11.34	19.04	11.94
4 1/2	"	"	"	"	"	"	19.36	12.26
5	"	"	14.96	8.57	23.66	12.94	20.08	12.98
6	"	"	"	"	24.04	13.32	20.80	13.70
9	"	"	"	"	24.92	14.20	24.32	17.22
12	"	"	"	"	25.64	14.92	"	"
18	16.10	10.87	"	"	"	"	"	"
24	"	"	22.09	15.70	29.22	18.50	30.98	23.88
48	"	"	25.94	19.55	32.42	21.70	"	"
72	"	"	"	"	32.64	21.92	"	"

I^e Série (Essais nos. 28—44). Température 50°. L'extrait de malt est fait d'une partie de malt vert et de deux parties d'eau; en 10^{cc}, il contient 5^{mg}.23 d'azote imprécipitable par le tannin.

II^e Série (Essais nos. 56—69). Elle ne varie de la I^{ère} que par le fait que l'azote de 10^{cc} d'extrait de malt imprécipitable par le tannin est de 6^{mg}.39.

III^e Série (Essais nos. 473—508). Température 47°. L'extrait de malt, préparé de trois parties de malt et de quatre parties d'eau, contient, en 10^{cc}, 19^{mg}.33 d'azote total, dont 10^{mg}.60 imprécipitable par le tannin. 10^{cc} de solution de protéine contiennent 29^{mg}.90 d'azote total. Le liquide à essayer en contient donc, en tout, 49^{mg}.23. De 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine 10^{mg}.72 d'azote sont imprécipitables par le tannin. A partir de cinq heures de temps d'essai on ajoute du thymol, qui ralentit un peu l'action.

IV^e Série (Essais nos. 647—670). Température 47°. Je n'ai pas de notes sur la préparation de l'extrait de malt, ni sur sa teneur en azote total. 7^{mg}.10 d'azote sont restés imprécipitables par le tannin. Aucune

addition d'antiseptiques. Au bout de 24 heures, l'odeur du liquide est assez fraîche, un peu acide, peut-être, mais nullement putréfiée¹⁾.

Les chiffres de la première colonne de chaque série du tableau indiquent la quantité totale d'azote devenue imprécipitable par le tannin, ceux de la deuxième colonne la quantité dédoublée pendant le temps d'essai.

On voit du tableau qu'une action manifeste se fait encore, à la II^e série et à la III^e série, dans l'espace de temps de 24 à 48 heures; tandis qu'il n'y en a point dans celui de 48 à 72 heures (III^e série).

Les courbes (v. Pl. IV) des I^{re} et II^e séries sont plus basses que celles des autres séries. Ceci est dû, partie à la faiblesse plus grande des extraits de malt, partie au fait que la température, 50°, est moins favorable que celle de 47°. Il faut attribuer à l'influence affaiblissante du thymol additionné sur l'enzyme le fait que la courbe de la III^e série descend vers l'axe des abscisses au bout de 5 heures. (Voir le tableau p. 187).

La Pl. IV présente encore une courbe indiquant les résultats d'essais faits pour faire voir la marche, pendant la première partie de la durée de l'expérience, de l'action révélée par la précipitation par le chlorure stanneux. La comparaison de cette courbe à celles du tannin présente un intérêt tout spécial.

V^e Série (Essais nos. 1917—26, 1946—52). Température 51°. L'extrait de malt se prépare de 3 parties de malt + 4 parties d'eau; en 10^{cc}, il contient 18^{mg}.54 d'azote. 10^{cc} de solution de protéine contiennent

Précipitation par le chlorure stanneux.

V^e Série. 51°.

	Az du filtrat	Az dédoublé	Az dédoublé par 15 minutes
	mg	mg	mg
Au bout de 0 minutes....	14.94	—	—
— 15 —	27.80	12.86	12.86
— 30 —	33.16	18.22	5.36
— 45 —	37.92	22.98	4.76
— 1 heure	40.04	25.10	2.12
— 2 heures.....	43.28	28.34	0.81
— 3 —	43.68	28.74	0.10
— 3¼ —	43.60	28.66	(÷ 0.08)

¹⁾ La réaction acide est, en elle, peu favorable au développement de bactéries. Je n'ai jamais observé de putréfaction ni d'autre fermentation au liquide à essayer, pas même après des essais prolongés, si l'extrait de malt et la protéine lactique sont mêlés ensemble. Il se produit vite, au contraire, une fermentation acide ou une putréfaction fétide à l'extrait de malt traité seul.

31^{mg}.74 d'azote: donc en tout 50^{mg}.28 d'azote. On chauffe d'avance les deux solutions à la température de l'expérience.

Ces chiffres et la courbe qu'on en a faite font voir combien est grande la vitesse de cette action. Elle atteint son maximum au bout de 2 heures environ. En tout cas, il n'y a pas d'accroissement à partir de 3—3¹/₄ heures, et, à en juger par d'autres essais (v. la série suivante), il faut supposer qu'au bout des 3 heures la courbe passerait presque parallèlement à l'axe des abscisses; aussi cette partie en est tracée sous forme d'une ligne ponctuée. L'accroissement est le plus fort pendant les premières 15 minutes, beaucoup moins fort pendant les 15 minutes suivantes, allant toujours en décroissant. On peut trouver l'explication de ce fait, partie en ce que les substances fermentescibles se consomment peu à peu, ce qui affaiblit la concentration, partie dans l'influence retardatrice des produits de dédoublement entassés.

En partant de la supposition qu'au moyen de précipitants différents on pourra diviser, par groupes, les matières albuminoïdes proprement dites et leurs produits de dédoublement, par exemple, d'après la méthode de H. Schjerning, j'en ai mis en jeu un certain nombre, variant mes essais de diverses manières, les continuant aussi pendant un temps plus ou moins long. Il est très intéressant de constater jusqu'à quel point le rapport entre les divers produits de dédoublement reste inaltéré ou varie pendant des temps d'essai où on est à même de maintenir à peu près constantes les autres conditions. J'ai obtenu des résultats intéressants, sous ce rapport, par les essais suivants:

VI^e Série (Essais nos. 1711—1776). Ignorant encore que les actions diverses avaient des températures optimæ diverses, j'ai fait ces essais à la température de 47°. L'extrait de malt est préparé de 3 parties de malt et de 4 parties d'eau. Il contient, par 10^{cc}, 18^{mg}.84 d'azote. 10^{cc} de la solution de protéine contenant 31^{mg}.46 d'azote, l'azote total du liquide est de 50^{mg}.30. Pour éviter des solutions trop étendues et pour économiser les précipitants, on se sert de fioles tarées à 50^{cc}. Aux essais durant 24 et 48 heures on ajoute, de temps en temps, du toluol. Outre le chlorure stanneux et l'acide tannique on emploie, comme précipitants, du sulfate de zinc et de l'acétate uranique. De plus, en distillant le liquide avec de la magnésie calcinée, on détermine directement la quantité d'azote présent, aux temps divers, sous la forme d'ammoniaque. — Avant de soumettre les résultats de ces essais, je ferai quelques observations sur le mode d'emploi de ces précipitants et sur le dosage de l'ammoniaque.

On a fait la précipitation par le sulfate de zinc d'après la méthode dont se sont servis A. Bömer¹⁾ et, après lui, E. Zunz²⁾, et d'autres.

¹⁾ A. Bömer, Zeitschr. für anal. Chemie (Fresenius) XXXIV, 562 (1895).

²⁾ E. Zunz, Zeitschr. für physiol. Chemie XXVII, 219 (1899).

Avant d'additionner le sulfate de zinc, on rend faiblement acide le liquide en ajoutant 1^{cc} d'acide sulfurique étendu (1 partie d'acide sulfurique concentré et 4 parties d'eau) pour empêcher la précipitation de phosphate de zinc. On ajoute un peu plus que la quantité nécessaire à la saturation du liquide de sulfate de zinc en poudre (environ 27^{gr}). On agite les fioles, qu'on remplit jusqu'au trait par une solution saturée du sel. Il faut avoir soin d'en ajouter assez pour qu'au bout de 24 heures il en reste encore un petit peu d'indissous. On dissout facilement, avant la filtration, ce restant en chauffant légèrement la fiole. L'évaporation du filtrat (avant l'addition d'acide sulfurique concentré) se fait dans une étuve à 105⁰, au courant de la nuit.

On précipite par l'acétate uranique d'après H. Schjerning¹⁾ en se servant d'une solution saturée, à 7 p. c. environ, de ce composé; on remplit jusqu'au trait de la fiole en ajoutant environ 30^{cc}. Après chauffage au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, le précipité se fait à souhait. On place les fioles dans un endroit où elles soient protégées contre la lumière jusqu'à la filtration.

On interrompt les essais pour le dosage d'ammoniaque en portant les fioles, pendant 5 à 10 minutes, au bain-marie en ébullition, arrêtant ainsi l'action des enzymes. Puis, pour tuer et pour exclure les bactéries, on ajoute une forte quantité de toluol. Plus tard, on chasse celui-ci en faisant bouillir, après l'addition d'un peu d'acide sulfurique étendu, au bain-marie (l'opération procède assez lentement à cause du point d'ébullition élevé du toluol), pour prévenir la formation de mousse pendant la distillation. On emploie 2^{gr} de magnésie calcinée à la distillation de chaque fiole. Le dosage d'ammoniaque se fait comme à l'ordinaire.

Les résultats de ces essais sont groupés au tableau suivant. Les chiffres de la première colonne de chaque précipitant indiquent, en milligrammes, la quantité d'azote imprécipitable par ce précipitant. Ceux de la deuxième colonne indiquent la quantité d'azote dédoublé par heure des temps d'essai successifs. Enfin, ceux au-dessous de „Magnésie“ indiquent la quantité d'azote présent sous forme d'ammoniaque et changé en ammoniaque par heure.

Ces résultats sont aussi montrés graphiquement à la Pl. V. La courbe de chlorure stanneux fait preuve du même accroissement rapide que la courbe correspondante de la série V. Au courant de la première heure, la plupart de l'azote dédoublable est dédoublée; au bout de trois heures, ceci est le cas pour, à peu près, tout l'azote dédoublable, c'est à dire presque tout l'azote-protéine en présence. Il y a,

¹⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXVII, 413 (1898).

VI^e Série. 47°. Azote total: 50^{mg}.30.

Nos. 1711—1776	Chlorure stanneux		Sulfate de zinc		Acide tannique		Acétate uranique		Magnésie	
	Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes	
	du filtrat	dédoublé par heure	du filtrat	dédoublé par heure	du filtrat	dédoublé par heure	du filtrat	dédoublé par heure	du liquide distillé	formé par heure
au bout de 0 heures	15.62	—	11.60	—	10.48	—	9.64	—	1.06	—
— - 1 —	40.40	24.78	18.64	7.04	16.96	6.48	20.12	10.48	1.35	0.29
— - 2 —	42.36	1.96	24.28	5.64	21.16	4.20	24.84	4.72	—	—
— - 3 —	43.76	1.40	25.24	0.96	23.52	2.36	26.74	1.90	2.84	0.75
— - 4 —	43.72	÷0.04	28.54	3.30	24.80	1.28	27.24	0.50	—	—
— - 5 —	43.76	0.04	30.04	1.50	25.80	1.00	28.80	1.56	—	—
— - 6 —	44.68	0.92	31.52	1.48	27.04	1.24	29.00	0.20	3.42	0.19
— - 9 —	45.16	0.16	34.12	0.87	31.16	1.37	32.20	1.07	—	—
— - 12 —	45.28	0.04	37.96	1.28	34.96	1.27	33.92	0.57	4.48	0.17
— - 24 —	45.76	0.04	40.44	0.21	38.04	0.26	—	—	4.76	0.02
— - 48 —	45.32	÷0.02	43.88	0.15	41.08	0.13	38.28	0.12	5.20	0.02

cependant, une faible croissance continue de 3 à 9 heures comprenant, en tout, environ 2^{mg} d'azote. De 9 à 48 heures, au contraire, la courbe passe absolument parallèlement à l'axe des abscisses. On peut, sans doute, attribuer les petites variations aux quantités d'azote qu'on y trouve aux erreurs expérimentales. — En constatant que l'action exprimée par la courbe de chlorure stanneux s'achève si vite, il faut se rappeler qu'on opère avec une concentration relativement faible de protéine (1 p. c.). En effet, d'autres essais ont démontré que l'aspect de la courbe est autre si on se sert de concentrations plus fortes (v. p. 198). Tandis que l'action révélée par la précipitation par le chlorure stanneux s'achève relativement vite, les autres courbes de précipitation montrent que la protéolyse continue par le dédoublement ultérieur des produits premièrement dédoublés. — Je n'entrerais pas ici en détail dans le côté qualitatif de la protéolyse. Je me contenterai de rappeler que le sulfate de zinc précipite, outre des albumines non dédoublées, les albumoses; que l'acide tannique, dans ce cas-ci, précipite probablement encore la plupart des vraies peptones; que, d'après Schjerning¹⁾, l'acétate uranique précipite tout ce qu'on appelle peptones et les dérivés ultérieurs en ne laissant dans la solution que les bases hexoniques, les amines, les amides et d'autres produits cristallins

¹⁾ Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXX, 419 (1898).

de dédoublement plus profonds. On voit donc que les actions qu'expriment ces courbes se continuent bien au-delà des 9 heures, et jusqu'à 12 heures, avec une intensité assez grande. De là, il y a un accroissement plus lent, mais toujours notable, jusqu'à 48 heures et, probablement, au-delà encore. Après les 48 heures, la courbe de sulfate de zinc est sur le point de couper la courbe de chlorure stanneux, ce qui revient à dire qu'à peu près toutes les albumoses formées d'abord se sont ultérieurement dédoublées. La distance entre la courbe de sulfate de zinc et celle d'acide tannique est restée presque constante entre 2 et 48 heures, ce qui semble indiquer que les substances marquées par cette distance sont ultérieurement décomposées presque aussitôt formées, n'étant qu'un point de passage des albumoses à d'autres composés. La courbe d'acétate uranique qui, pendant les 3 premières heures, passe très près de celle du sulfate de zinc, s'incline, au bout de ce temps, en descendant, et vient couper la courbe d'acide tannique; mais, au bout de 12 heures, elle passe de nouveau presque parallèlement aux autres courbes avec un accroissement continu jusqu'à 48 heures. Au bout de ce temps, la partie de beaucoup la plus grande (75.1 p. c.) de l'azote total se trouve dans des composés plus simples que les peptones (c.-à-d. imprécipitables par l'acétate uranique), tandis qu'au commencement de l'essai il n'y avait que 19.1 p. c. de ces matières (c.-à-d. 57 p. c. en ont été dédoublés). La courbe indiquant l'azote distillé directement par la magnésie nous dit encore que la protéolyse est avancée jusqu'à la formation d'ammoniaque, dont il s'est formé des quantités assez considérables.

En résumé, on voit que le tableau qui se dessine des différentes phases de la protéolyse, si on recourt à l'emploi de précipitants divers, varie beaucoup avec le temps d'essai: celui-ci est un agent ayant une influence décisive sur les résultats auxquels on arrive en faisant varier un facteur pendant des temps d'essai variés.

5. Dépendance du temps à des températures différentes.

Il est naturel de supposer, à priori, qu'à une température au-dessous de l'optimum une enzyme pourra produire essentiellement le même effet qu'à ce point-là, si on lui laisse un temps d'agir assez long. Mais si on la fait agir à des températures au-dessus de l'optimum, il arrivera peut-être que, tout long que soit le temps d'essai, il ne pourra remédier au manque d'une température favorable. En effet, il se peut que la température élevée ait pour effet, non pas de retarder l'action diastasique, mais d'affaiblir l'activité de l'enzyme même, la rendant inerte peu à peu, ou même la décomposant complètement. Ainsi donc la différence entre les actions exercées sur l'enzyme par les tem-

pératures au-dessous et au-dessus de l'optimum sera tant qualitative que quantitative.

Les essais suivants nous renseigneront peut-être sur la question de savoir jusqu'à quel point ces suppositions tiennent bon dans notre cas.

Essais nos. 1869 — 1916. En 10^{cc}, l'extrait de malt contient 18^{mg}.20 d'azote, la solution de protéine en contient 30^{mg}.60. Il y a donc 48^{mg}.80 d'azote total. Les essais sont groupés en cinq séries aux températures respectives de 20°, 35°, 50° (47°—50°), 60°, 65°. Le temps d'essai varie au-dedans de chaque série. Pour chaque série on emploie 42^{cc} de la solution de protéine et 43^{cc} d'extrait de malt. Avant de les mélanger (donc au commencement de l'essai), on les chauffe à la température d'essai. Après les avoir mélangés dans des fioles de 100^{cc}, on les secoue vigoureusement. Puis on les met dans des bains-marie, où on les laisse aux températures voulues.

I^{ère} Série. 20°.

	Précipitation par le chlorure stanneux		Précipitation par l'acide tannique	
	Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg
Au bout de 0 heure ..	17.12	0.00	10.00	0.00
— 1/2 — ..	19.20	2.08	10.52	0.52
— 1 — ..	22.56	5.44	(11.00)	(1.00)
— 2 heures .	25.44	8.32	11.48	1.48
— 4 — .	33.00	15.88	12.68	2.68

II^e Série. 35°.

III^e Série. 50°. ¹⁾

	Précipit. par le chlorure stann.		Précipit. par l'acide tannique			Précipit. par le chlorure stann.		Précipit. par l'acide tannique	
	Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dédoublé		Az du filtrat	Az dédoublé	Az du filtrat	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg		mg	mg	mg	mg
Au bout de 0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00	Au bout de 0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00
1/2 —	24.64	7.52	11.56	1.56	1/2 —	31.68	14.56	12.40	2.40
1 —	31.92	14.80	13.08	3.08	1 —	37.68	20.56	14.40	4.40
2 heures	37.20	20.08	15.64	5.64	2 heures	39.84	22.72	17.20	7.20
4 —	39.44	22.32	18.36	8.36	4 —	41.04	23.92	20.40	10.40

¹ La température varie, dans cette série, entre 47° et 50°.

IV^e Série. 60°.V^e Série. 65°.

	Précipit. par le chlo- rure stann.		Précipit. par l'acide tannique			Précipit. par le chlo- rure stann.		Précipit. par l'acide tannique	
	Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dé- doublé		Az du filtrat	Az dé- doublé	Az du filtrat	Az dé- doublé
Au bout de	mg	mg	mg	mg	Au bout de	mg	mg	mg	mg
0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00	0 heure	17.12	0.00	10.00	0.00
1/2 —	23.20	6.08	11.92	1.92	1/2 —	22.72	5.60	10.80	0.80
1 —	(34.80) ¹	17.68	12.96	2.96	1 —	24.00	6.88	11.28	1.28
2 heures	35.12	18.00	14.08	4.08	2 heures	25.28	8.16	11.28	1.28
4 —	37.04	19.92	15.12	5.12	4 —	25.76	8.64	11.44	1.44

A divers temps, au bout de $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 heures, on tire, après avoir secoué, de chaque fiole $2 \times 10^{\text{cc}}$ pour précipiter par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. Ainsi on n'emploie, pour les précipitations, que la moitié de liquide de ce qu'on emploie aux autres essais. Comme les dosages de l'azote sont faits à la moitié des filtrats, les chiffres trouvés sont multipliés par 4 et non pas par 2, comme c'est le cas ailleurs. Les résultats se voient des tableaux ci-dessus.

On a aussi montré ces résultats aux planches VI et VII au moyen de courbes en prenant pour abscisses le temps et la température, et pour ordonnées „l'Az du filtrat“. On a choisi ces chiffres-là plutôt que ceux qui indiquent la quantité d'azote qui se soustrait à la précipitation par les deux précipitants pendant les temps d'essais, afin de rendre clair le rapport de ces deux courbes de précipitation. Comme points de départ du mesurage des deux courbes de 17.12 et de 10.00 on a tracé, sur les planches, une ligne ponctuée parallèle à l'axe des abscisses et qui indique la quantité d'azote des essais passifs qui, dès le commencement, se soustrait à la précipitation par le chlorure stanneux et par l'acide tannique.

Si, pour commencer, on regarde la Pl. VI, celle-ci semble parfaitement confirmer la supposition préconçue: les courbes de 20° et de 35° montrent un accroissement continu avec le temps. Si on avait continué les essais assez longtemps, elles auraient atteint (à l'exception, peut-être, de la courbe de l'acide tannique de 20°) la hauteur des

¹⁾ Ce chiffre, évidemment, est trop élevé. J'ai aussi noté dans mon journal: „La température du bain-marie de 60° n'est pas restée constante tout le temps. De 0 à $\frac{1}{2}$ heure, elle n'a été que de 58°—59°; entre $\frac{1}{2}$ et 1 heure, elle a même, pendant un petit temps, descendu à 54°. Cette circonstance aura, sans doute, influé, dans le même sens, les autres chiffres de cette série.

courbes de 50° . C'est surtout l'accroissement de la courbe de chlorure stanneux de 20° qui est caractéristique: ici l'action est, à très peu près, proportionnelle au temps. Il est intéressant de comparer les courbes de chlorure stanneux de 35° et de 50° : elles marchent de front de telle façon que la première, au bout d'un temps d'essai double, a atteint tout juste la hauteur de la seconde. Les deux courbes de 60° sont, évidemment, un peu trop élevées (v. la note 2 de la p. 194); ceci est le cas, surtout, pour la courbe de chlorure stanneux de 1 heure. Cependant elles sont, toutes les deux, plus basses que les courbes de 35° , ayant une tendance prononcée à aller parallèlement à l'axe des abscisses au bout de 2 heures, tandis que l'action de la première demi-heure est la même, à peu près, qu'à 35° . Les courbes de 65° sont particulièrement intéressantes. Pendant la première demi-heure la différence entre celles-ci et les courbes de chlorure stanneux de 35° et de 60° correspondantes est presque nulle, mais pendant la demi-heure suivante, l'accroissement de la courbe de 65° est minime, étant plus faible encore de 1—2 heures; de 2—4 heures elle va, pour ainsi dire, parallèlement à l'axe des abscisses: pendant ce temps toute action a cessé. La courbe d'acide tannique atteint ce point déjà au bout de 1 heure, tandis que la courbe de chlorure stanneux continue à monter un peu de 1—2 heures. Par conséquent, l'action révélée par la précipitation par l'acide tannique (l'action trypsique) est encore plus sensible à la température élevée que l'action pepsique; en d'autres mots: la tryptase est complètement décomposée à 65° au bout d'une heure, tandis que la peptase n'est pas encore complètement décomposée au bout de 2 heures.

Les courbes de la Pl. VII mettent en évidence les mêmes résultats d'une autre manière, faisant voir plus facilement combien est avancée la protéolyse à des températures diverses, au bout de temps divers. Aussi n'entrerais-je pas plus avant dans des explications détaillées.

Il serait intéressant d'examiner si un extrait de malt, chauffé pendant 1—2 heures à 65° , a perdu pour toujours son pouvoir fermentatif, ou s'il n'est que paralysé pouvant redevenir actif à des températures plus basses. Je n'ai pas fait d'expériences directes à ce sujet. Mais Kjeldahl¹⁾ a examiné la question par rapport à la diastase. Il a trouvé que le pouvoir diastasique d'un extrait de malt qui a été exposé une fois à une température au-delà de l'optimum, est tellement affaibli que soumis, plus tard, à des températures plus favorables, il n'est pas régénérable, l'affaiblissement étant d'autant plus grand que l'extrait de malt a été exposé plus longtemps à la tempé-

¹⁾ J. Kjeldahl: Ces Comptes-rendus, I 121 (1879).

rature élevée. Il est probable qu'il en est de même pour les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt. On y aura un parallèle complet de ce qui se passe chez les cellules vivantes telles que les bactéries: il y a une température maxima à laquelle on ne peut pas les chauffer sans les tuer, de même qu'elles sont tuées aussi si on les soumet à l'action plus ou moins prolongée de températures, au-dessous de celle-là, mais au-dessus de leur optimum¹⁾.

6. Dépendance du temps à des quantités de ferment différentes.

De même que les courbes de temps varient d'après les températures et que les courbes de température dépendent du temps, de même les courbes de temps varient d'après les quantités de ferment, et vice versa. Or, il s'agit de savoir s'il faut une quantité déterminée d'enzyme pour conduire, indépendamment du temps, une réaction à un point déterminé: ainsi, la transformation complète de la protéine demande-t-elle une quantité déterminée d'un ferment protéolytique, ou bien une quantité quelconque de ferment, toute petite qu'elle soit, conduit-elle la transformation aussi loin qu'une quantité plus grande, pourvu que celle-là agisse pendant un temps d'autant plus étendu? D'autre part, la réaction ne dépasse-t-elle jamais un point déterminé même en augmentant, sans restriction, la quantité de ferment? Pour éclaircir l'action des enzymes protéolytiques sous ce rapport, j'ai fait les essais que voici:

Essais nos. 1917—1945. Le chlorure stanneux seul servant de précipitant les résultats ne portent que sur la peptase. Température 51°—52°. En 10^{cc}, l'extrait de malt contient 18^{mg}.54 d'azote, la solution de protéine, à 2 p. c., 31^{mg}.74 d'azote: 12^{mg}.42 et 1^{mg}.64 d'azote respectivement sont imprécipitables au chlorure stanneux. La quantité d'extrait de malt varie allant de 0^{cc}, 2^{cc}, 4^{cc}, 6^{cc}, 8^{cc} à 10^{cc}. Le volume du liquide à essayer est toujours de 20^{cc}; si le volume de l'extrait de malt est au-dessous de 10^{cc}, on ajoute de l'eau pour arriver à ce volume. L'azote total varie avec l'extrait de malt (v. le tableau). Les essais sont faits en 3 séries durant 1, 2, 3 heures. En voici les résultats:

Les chiffres de l'azote dédoublé (en milligrammes) sont inscrits sur la Pl. VIII *a* et *b* comme ordonnées ayant pour abscisses l'extrait de malt (en centimètres cubes) et le temps (en heures). On a ainsi la mesure directe de l'action de la même quantité d'extrait de malt (autrement d'enzyme) pendant les temps différents, ou bien celle de l'extension de la protéolyse en employant, pendant le même temps, des quantités différentes d'extrait de malt.

¹⁾ V. Schmidt und Weis: Die Bakterien, Jena 1902, p. 152 ss.

31 ^{mg} .74 d'Az-protéine	Az total	Az des liquides filtrés				Az dédoublé		
		pour com- mencer	au bout de 1 heure	au bout de 2 heures	au bout de 3 heures	au bout de 1 heure	au bout de 2 heures	au bout de 3 heures
0 ^{cc} d'extrait de malt à 0 ^{mg} .00 d'Az	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
2 ^{cc} — — 3 ^{mg} .71 —	31.74	1.64	1.64	1.64	1.64	0.00	0.00	0.00
4 ^{cc} . — — 7 ^{mg} .40 —	35.45	4.12	9.32	10.84	12.00	5.20	6.72	7.88
6 ^{cc} — — 11 ^{mg} .10 —	39.14	6.60	18.96	22.04	24.16	12.36	15.44	17.56
8 ^{cc} — — 14 ^{mg} .80 —	41.84	9.08	27.68	32.56	34.36	18.60	23.48	25.28
10 ^{cc} — — 18 ^{mg} .54 —	46.54	11.56	35.44	38.84	39.68	23.88	27.28	28.12
	50.28	14.06	42.08	43.28	43.32	28.02	29.22	29.26

Si on examine la Pl. VIII *a* on trouvera que les actions, pendant la première heure, sont presque proportionnelles aux quantités d'enzyme aussi loin qu'à 10^{cc}; mais pendant la deuxième heure, la proportionnalité ne se maintient que jusqu'à 6^{cc}; il en est de même, à peu près, pendant la troisième heure. Avec 10^{cc} le maximum d'action s'atteint au bout de la première heure, à peu près. L'action ne va pas plus loin en 3 qu'en 2 heures, vu qu'il n'y a plus de protéine à dédoubler. Avec 8^{cc} d'extrait de malt, la quantité d'azote dédoublée en 3 heures est tout juste égale à celle qui, avec 10^{cc}, est dédoublée en 1 heure. — La Pl. VIII *b* fait voir que l'action de n'importe quelle quantité d'enzyme est beaucoup plus forte pendant la première que pendant la deuxième et la troisième heure et que, pour les petites quantités d'enzyme (2^{cc} et 4^{cc}), ce fait ne s'explique pas par le manque de matières fermentescibles. Ce n'est qu'avec 10^{cc} et 8^{cc} que la réaction peut être considérée comme terminée au courant des trois heures (avec 10^{cc} déjà au bout de 2 heures). Avec 6^{cc}, il ne reste qu'un petit peu pour que la réaction se termine. Avec 4^{cc}, elle pourrait peut-être se terminer au courant de 4—5 heures. Avec 2^{cc}, il lui faudrait un temps beaucoup plus long, si tant est qu'elle arrive jamais à son terme.

Si, au moyen de ces résultats, on cherche à répondre aux questions posées à la page 196, il faudra regretter tout d'abord que les temps n'aient pas été plus étendus. On voit, sans doute, qu'au-dedans d'un temps donné une quantité de ferment plus grande (10^{cc}) ne mène pas le dédoublement plus loin qu'une quantité moins grande (8^{cc}). Les essais, cependant, ne répondent pas directement à la question de savoir si les petites quantités de ferment (2^{cc} et 4^{cc}) auraient pu mener la réaction au même point. Si j'avais opéré avec une concentration de protéine plus forte (comp. les essais p. 199) mes courbes auraient eu, sans doute, la même forme, essentiellement, qu'elles ont maintenant, montant, cependant, un peu plus haut pour les quantités d'enzyme plus grandes.

Elles auraient, probablement, fait le parcours, à peu près, que font les courbes qu'a trouvées Kjeldahl pour les actions de quantités de diastase différentes pendant des temps différents. Seulement, elles n'auraient pas une tendance aussi prononcée à courir parallèlement à l'axe des abscisses au-dedans des temps employés, quoique mes essais s'étendent sur un temps plus de trois fois aussi long que celui de Kjeldahl¹⁾ (comp., par exemple, les essais plus bas (p. 199) sur l'action de 10^{cc} d'extrait de malt sur une solution de protéine à 5 p. c. pendant 48 heures et au-dessous).

7. Dépendance du temps à des concentrations de protéine différentes.

Pendant plusieurs des essais nommés, entre autres pendant ceux auxquels on examine l'influence du temps sur la protéolyse au moyen de précipitants (VI^e Série, essais 1711—1776, v. p. 189), on est arrivé assez vite ou, en tout cas, au bout de quelques heures, à l'action maxima de la phase de la protéolyse (formation d'albumoses, action de la peptase) qui peut être déterminée par la précipitation par le chlorure stanneux. Il ne reste qu'un tout petit peu d'azote non attaqué, qui peut provenir tout entier du contenu de matières albuminoïdes de l'extrait de malt même, tandis que toute la protéine, ou à peu près, est dédoublée. Alors se pose la question si, en opérant avec des concentrations de protéine plus fortes, on pourrait conduire la réaction proportionnellement aussi loin, ou si elle s'arrêterait à un point déterminé, indépendamment de la protéine restée au liquide d'essai; ou encore si, pour un temps déterminé, une certaine quantité d'extrait de malt (d'enzyme) ne pourrait dédoubler, avant que la réaction eût atteint son maximum, qu'une quantité déterminée de matières albuminoïdes, ou enfin si son pouvoir fermentatif était proportionnel à la quantité de matières fermentescibles présentes au commencement de l'essai. Enfin, il importe de connaître le pouvoir fermentatif maximum d'un extrait de malt.

J'ai donc fait une série d'essais aux conditions identiques, autant que possible, à celles des essais nos. 1711—1776 (v. p. 189), si ce n'est que j'ai opéré avec des concentrations plus fortes (2¹/₂ et 5 p. c.) de protéine. J'ai, naturellement, dû me servir d'un autre extrait de malt. Mais contenant la même quantité d'azote, à peu près, il a dû posséder, approximativement, le même pouvoir fermentatif. On est donc en droit de comparer tous ces essais, ainsi qu'on a fait dans le

¹⁾ V. ces Comptes-rendus I, 145 (1879).

1 p. c. de protéine (nos. 1711 — 1776).	2 ¹ / ₂ p. c. de protéine (nos. 2261 — 2310).	5 p. c. de protéine (nos. 2261 — 2310).
En 10 ^{cc} d'extraît de malt 18 ^{mg} .84 d'Az total	En 10 ^{cc} d'extraît de malt 19 ^{mg} .14 d'Az total	En 10 ^{cc} d'extraît de malt 19 ^{mg} .14 d'Az total
— — de solut. de prot. 31 ^{mg} .46 —	— — de solut. de prot. 78 ^{mg} .85 —	— — de solut. de prot. 144 ^{mg} .20 —
Total 50 ^{mg} .30 d'Az total	Total 97 ^{mg} .99 d'Az total	Total 163 ^{mg} .34 d'Az total

nombre d'heures	Az du liquide filtré du chlorure stanneux		Az du liquide filtré de l'acide tannique		Az du liquide filtré du chlorure stanneux		Az du liquide filtré de l'acide tannique		Az du liquide filtré de l'acide tannique	
	Az dédoublé	p. c. d'Az total	Az dédoublé	p. c. d'Az total	Az dédoublé	p. c. d'Az total	Az dédoublé	p. c. d'Az total	Az dédoublé	p. c. d'Az total
0	mg 15.62	31.1	mg 10.48	20.8	mg 14.44	14.7	mg 9.90	10.1	mg 15.28	9.4
1	40.40	80.3	16.96	33.7	57.0	58.2	—	—	62.6	38.3
2	42.36	84.2	21.16	42.1	68.4	69.8	24.4	24.9	78.7	48.2
3	43.76	87.0	23.52	46.8	71.4	72.9	—	—	90.0	55.5
4	43.72	86.9	24.80	49.3	74.4	75.9	—	—	94.1	57.6
5	43.76	87.0	25.80	51.3	77.2	78.8	32.4	33.1	96.3	59.0
6	44.68	88.8	27.04	53.8	78.6	80.2	—	—	101.6	62.2
9	45.16	89.8	31.16	61.9	82.6	84.3	—	—	111.6	68.3
12	45.28	90.0	34.96	69.5	83.4	85.1	46.0	46.9	117.0	71.6
24	(45.76)	(91.0)	38.04	75.6	84.8	86.5	56.4	57.6	127.4	78.0
48	45.32	90.1	41.08	81.7	86.8	88.6	64.0	65.3	140.0	85.7

tableau p. 199. Pour le faire bien comprendre, voici quelques observations sur le mode d'expérimentation, surtout sur les précipitations et les dosages d'azote de ces essais nouveaux.

Essais nos. 2261—2310. On prépare deux solutions d'environ 5 et 10 p. c. de protéine dans de l'acide lactique à 0.4 p. c. Après avoir été chauffées au bain-marie pendant peu de temps, les deux solutions sont parfaitement claires. En mélangeant avec des volumes égaux d'extraits de malt, les concentrations de protéine seront de $2^{1/2}$ et de 5 p. c., à peu près. Voir le tableau pour la teneur en azote des solutions et de l'extrait de malt. Pour s'assurer d'une précipitation complète et pour n'avoir pas des quantités d'azote trop grandes à manier, on n'opère qu'avec 5^{cc} de solution de protéine + 5^{cc} d'extrait de malt. Le mélange est porté dans des fioles jaugées de 50^{cc}, bouchées de bouchons de liège pendant toute la durée des essais. On précipite par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On emploie 30^{cc} du chlorure de la force¹⁾ ordinaire + 10^{cc} de chlorure de calcium. Du tannin, on emploie 20^{cc} qu'on remplit d'eau (20^{cc}) jusqu'au trait. Pour doser l'azote, on emploie aux essais de contrôle (auxquels la précipitation se fait tout de suite) 25^{cc} du liquide filtré, mais aux essais actifs, contenant de l'azote dédoublé, 10^{cc} seulement du liquide filtré. On calcule l'azote trouvé pour 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt en multipliant par 4 et par 10. — La température est de 50°. On ne se sert d'aucun antiseptique, la température élevée ainsi que l'acide lactique entravant le développement de bactéries. En effet, au bout de 48 heures le liquide sent tout frais, n'offrant aucun signe d'infection.

Pour constater incontestablement que ce n'est pas une action sur la protéine (transformée en syntonines, etc.) de l'acide lactique, mais bien les actions d'enzyme qui causent la manière de se comporter changée de cette substance à l'égard des précipitants, particulièrement du chlorure stanneux, on a fait quelques essais témoins, auxquels 5^{cc} de chaque solution de protéine reste, pendant 24 heures, à 50°, additionnée de 5^{cc} d'eau au lieu d'extrait de malt. Voici les résultats de dosages d'azote faits en 25^{cc} des liquides filtrés (50^{cc} en tout) provenant de la précipitation par le chlorure stanneux:

¹⁾ Suivant Schjerning (Zeitschr. f. anal. Chemie XXXV, 287 et XXXVI 651) 1^{mg} d'azote demande, pour être précipité, 1^{cc} de chlorure stanneux. Dans ce cas, 30^{cc} ne suffiront pas dans tous mes essais. Mais le fait est que la protéine non attaquée est précipitée par l'acide chlorhydrique fort de la solution de ce chlorure dans lequel la protéine est insoluble. Cette précipitation se fait quantitativement entre certaines limites.

		Az du liquide filtré	
		au commencement	au bout de 24 heures à 50°
2 ¹ / ₂ p. c. de solution de protéine		1 mg.28	1 mg.08
5 — — — —		2 mg.20	1 mg.76

Les résultats montrés au tableau p. 199 étaient pour moi une révélation pleine de surprise; ils le seront peut-être aussi pour d'autres. En effet, si on considère que l'orge en germination contient des enzymes douées de propriétés protéolytiques tellement puissantes, il est presque incompréhensible qu'elles aient pu si longtemps échapper à l'attention des savants, d'autant plus que ce grand pouvoir fermentatif appartient, non pas seulement à l'enzyme pepsique mais encore à l'enzyme trypsique. Aux essais à 5 p. c. de protéine le dédoublement est tellement intensif qu'il ne le cède guère à la fermentation la plus vive changeant le sucre en alcool et en acide carbonique. C'est seulement parce qu'elle n'est accompagnée ni de dégagement de gaz ni de formation de matières odorantes que la protéolyse ne se fait pas directement connaître. Ce ne sont que les précipitations suivies de dosages d'azote aux précipités ou aux produits filtrés, opérations qui demandent quelques jours pour s'accomplir, qui nous apprennent qu'en général il se passe quelque chose.

Si on examine de plus près les résultats des essais, c'est en se rapportant aux représentations graphiques, comme aux Pls. IX et X, qu'on en a le plus facilement un aperçu. Les chiffres du tableau permettent la construction de bien des systèmes de courbes, et des conclusions nombreuses. Je me bornerai ici à attirer l'attention sur ce que nous apprennent les planches. Sur la première (Pl. IX), les résultats se trouvent exprimés d'après les chiffres directement trouvés: les ordonnées indiquent la quantité d'azote, exprimée en milligrammes, qui se soustrait au précipitant au bout des différents temps, marqués sur l'axe des abscisses; les lignes droites expriment la quantité d'azote total des différentes concentrations. Sur la seconde planche (Pl. X), les ordonnées indiquent la quantité, pour 100, d'azote total qui est dédoublee au bout des différents temps.

On voit donc que la quantité d'enzyme, tant pepsique que trypsique, qui se trouve en 10^{cc} d'extrait de malt, est à même de dédoubler, dans les limites des temps employés, beaucoup plus d'azote que celui qui se trouve en 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. + 10^{cc} d'extrait de malt. Si, dans ce dernier cas, la courbe de chlorure stanneux passe, après si peu de temps, parallèlement à l'axe des abscisses, ce n'est que parce que la matière fermentescible vient à manquer. Même à la première heure, la formation d'albumoses va en croissant

avec la concentration de la protéine au-delà de $2\frac{1}{2}$ p. c. Il en est de même pour l'action donnant naissance à des corps amidés, surtout au bout de deux heures, malgré le grand nombre d'albumoses qui existent encore dans la solution à 1 p. c. Cependant l'accroissement de $2\frac{1}{2}$ p. c. à 5 p. c. étant assez faible, il est probable qu'une concentration intermédiaire donnera l'action maxima. Une comparaison avec des essais traités plus haut (p. 185) fait supposer que cette concentration sera d'environ 3—4 p. c. Au bout de 48 heures, la formation d'albumoses à la solution de protéine à $2\frac{1}{2}$ p. c. est à peu près aussi avancée, pour cent d'azote, qu'à la solution à 1 p. c.; à la solution à 5 p. c. elle n'est pas loin d'être arrivée au même point¹⁾. Tout porte à croire que si on avait prolongé le temps des essais, les trois courbes de chlorure stanneux de la Pl. X se seraient coupées les unes les autres. — Le dédoublement plus profond, l'activité trypsique, s'opère, sans doute, avec plus de lenteur l'enzyme actif ayant ici, à ce qu'il faut croire, comme matériaux de fermentation les albumoses et les peptones formées par l'autre enzyme²⁾. Mais les chiffres et les courbes nous montrent bien clairement que le dédoublement a une extension considérable aussi quantitativement. Ainsi on voit qu'au bout de 48 heures il y a aux trois concentrations 41^{mg.}08, 64^{mg.}0, 83^{mg.}0 d'azote ou 81^{mg.}7, 65^{mg.}3, 50^{mg.}8 p. c. de l'azote total qui sont dédoublés en corps imprécipitables par l'acide tannique. Il n'y a pas de doute qu'un temps d'essai plus étendu n'eût donné des chiffres plus élevés, puisque toutes les courbes continuent de monter entre 24 et 48 heures. — Dans la solution de protéine à 5 p. c. la courbe de chlorure stanneux et la courbe de tannin sont presque parallèles pendant tout le temps d'essai, en d'autres mots l'activité pepsique et la trypsique se sont faites avec une intensité presque égale, ce qui semble indiquer que celle-ci dépend de celle-là.

Rien dans les essais ne porte à croire que l'entassement des produits de fermentation ait retardé sensiblement l'action des enzymes. La lenteur successive de celle-ci ne s'explique que par la diminution de la matière fermentescible. Il est vrai que les produits formés par l'enzyme pepsique (les albumoses et les peptones) s'écartent peu à peu l'enzyme trypsique continuant leur dédoublement, mais bien avant que ce dédoublement se manifeste d'une façon sensible la formation d'al-

¹⁾ Ceci sauterait aux yeux beaucoup plus si on dressait la courbe du dédoublement de la protéine seule.

²⁾ Peut-être aussi est-elle à même de former elle même des albumoses et des peptones en dédoublant des matières albuminoïdes comme le fait, d'après ce qu'on pense, la trypsine animale; à moins que là aussi il ne s'agisse de deux enzymes.

bumoses, aux essais à 1 p. c. de protéine, a atteint son maximum, au bout de 3—6 heures, tandis que tout accroissement ultérieur, causé par l'écartement de quantités de plus en plus grandes des albumoses, est hors de question. Lorsque, comme c'est le cas pour les essais à 5 p. c. de protéine, les matériaux de fermentation se présentent en quantité à la tryptase, l'activité de celle-ci ne semble pas retardée par l'entassement des produits de fermentation qu'elle forme elle-même.

Si on compare ces essais avec ceux traités plus haut, à la p. 197, ceux, surtout, auxquels on se sert de 2^{cc} d'extrait de malt, il en résulte encore que la concentration de protéine joue un rôle important pour l'étendue du dédoublement. Les 2^{cc} d'extrait de malt sont loin, dans la solution de protéine à 1 p. c., de dédoubler autant, relativement, que le font ici les 10^{cc} dans la solution à 5 p. c. Aussi peut-on être sûr que 2^{cc} auraient dédoublé beaucoup plus dans une solution à 5 p. c. que dans une solution à 1 p. c., pendant le même temps.

Enfin, malgré la force de la concentration de protéine par rapport à la quantité de ferment, et malgré l'étendue du temps (48 heures), il paraît qu'on n'a pas atteint le point où 10^{cc} d'extrait de malt ne pourront pas dédoubler plus d'azote pourvu qu'on y donne le temps nécessaire, tandis que pour 100 de protéine totale le dédoublement pepsique est conduit presque au même point pour toutes les concentrations de protéine, au bout de 48 heures.

8. Dépendance de la présence de matières étrangères.

On sait que, pour certaines enzymes, l'influence sur les matières qu'elles sont à même de dédoubler, dépend de la présence d'une certaine troisième substance, ou qu'elle en est sensiblement augmentée. Ainsi la pepsine demande la présence d'un acide; la présure et la pectase exigent celle d'un sel de chaux ou d'un des autres métaux alcalino-terreux; la trypsine animale agit le plus vigoureusement à une réaction faiblement alcaline. A toutes les recherches de ferment c'est une question très importante de savoir si l'action chimique dépend d'une telle matière étrangère et, surtout, de connaître de quelle manière et à quel degré la réaction du milieu influe sur cette action.

Si, comme en ce cas-ci, on opère avec un extrait de malt qui, avec les enzymes, contient un grand nombre d'autres corps, il est très important de connaître l'influence qui s'exerce mutuellement entre les enzymes et ces corps. Il est important aussi de connaître l'influence réciproque entre les enzymes et les corps (acides, alcools etc.)

qui se forment souvent „spontanément“ pendant d'autres fermentations, par l'action de microbes sur l'extrait de malt. En suite, il est d'un grand intérêt d'éclaircir les rapports des enzymes aux substances que, dans la pratique, où il est question de l'action diastasique (par exemple, pendant le brassage), on ajoute au malt (sucres, principes amers du houblon, etc.). Il est encore d'importance de connaître l'influence des antiseptiques le plus en usage, puisqu'en étudiant une action d'enzyme il s'agit toujours d'exclure l'intervention perturbatrice des microbes. Certaines substances (les phosphates, par exemple) produisant une influence spécifique sur certaines enzymes il est naturel de les comprendre aussi dans des essais d'orientation. Enfin, il faut considérer la possibilité d'une action réciproque d'enzymes se trouvant au même extrait (par exemple, elles peuvent se détruire les unes les autres). Il se présente donc une foule de questions qui demanderaient à être examinées.

Du nombre j'ai choisi quelques-unes parmi celles qui portent le plus sur mon sujet, examinant, provisoirement, l'influence d'acides, de bases, de l'alcool, de quelques antiseptiques. Et même, pour la plupart des cas, je me suis borné à examiner leur influence sur l'enzyme trypsique, m'étant servi le plus souvent, comme précipitant, du tannin auquel j'ai ajouté, dans quelques cas, le chlorure stanneux.

Ce qui présente le plus d'intérêt, ce serait de connaître la marche de la protéolyse dans l'absence de ces matières¹⁾ ou, du moins, d'acides et de bases, c'est à dire, à réaction neutre du milieu. Si je n'ai aucun essai direct en milieu neutre à présenter c'est que les matières albuminoïdes avec lesquelles j'ai opéré, étaient insolubles dans l'eau, et que je n'ai pas examiné leur solubilité dans les solutions salines neutres (sel de cuisine). Pour les essais d'autodigestion seuls, dont j'ai fait une série sans additionnement d'acide, on pourra peut-être parler d'essais faits en milieu neutre; mais encore est-ce matière à discussion: en effet, on sait qu'un extrait de malt réagit acide sur nos indicateurs ordinaires (teinture de tournesol, phénol-phtaléine, et d'autres); ainsi pour la neutralisation de 10^{cc} de l'extrait que j'ai préparé il faudra 1^{cc}.25—3^{cc}.0 de solution d'hydrate de sodium normale au 1/10. Mais les savants qui ont particulièrement examiné cette question (Ad. Ott²⁾, Eug. Prior³⁾, et d'autres) ne sont pas d'accord, les uns attri-

1) Naturellement, il n'y a pas moyen d'éviter des matières étrangères, tant qu'on n'aura pas produit les enzymes à l'état pur.

2) Ad. Ott: Zeitschr. f. d. gesammte Brauwesen XX, 633—36 (1897).

3) Eug. Prior: Bayrisches Brauer-Journal VIII nos. 31—36 (1898).

buant l'acidité à des sels acides, surtout à des phosphates primaires, les autres à des acides libres.

Cependant, les essais que je vais décrire donnent des indications qui permettent de juger de l'influence plus ou moins favorable qu'exerce sur la protéolyse la réaction neutre. En effet, l'action a toujours été extrêmement faible aux concentrations d'acide les plus faibles que j'aie pu obtenir. J'ose donc émettre la supposition qu'à réaction neutre du liquide ces enzymes n'ont qu'une action très faible sur les matières albuminoïdes examinées par moi.

Acides et bases.

Parmi les acides, j'ai examiné les deux acides organiques les plus répandus dans la pratique et qui peuvent jouer un rôle dans la fabrication de la bière: l'acide lactique et l'acide acétique. A titre de comparaison j'ai opéré aussi avec deux acides minéraux: l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, et avec deux bases: l'hydrate et le carbonate neutre d'un métal alcalin. A part l'acide lactique, j'ai, dans mes essais, opéré avec des liqueurs normales. Mais comme les extraits de malt des différentes séries varient entr'eux et qu'aux essais des bases je me suis, en partie, servi d'une autre substance protéique, les chiffres trouvés ne donnent pas la mesure directe de l'influence du corps examiné. Le plus souvent, lorsque l'essai portait sur un autre acide ou sur une base, j'ai fait des essais comparatifs avec une solution aqueuse d'acide lactique à 0.2 p. c.

En quelques cas j'ai suivi l'influence de l'augmentation de l'acide sur l'autodigestion de l'extrait de malt. Généralement, j'ai encore examiné l'influence de l'acide ou de la base sur la protéine seule, sans addition d'extrait de malt, toujours remplissant d'eau jusqu'à 20^{cc}.

Il y a toujours, au moins en descendant, eu des limites naturelles aux concentrations des acides et des alcalis se prêtant à des expériences. En effet, j'étais toujours obligé de commencer par dissoudre la substance protéique dans les liquides, et, par conséquent, sa solubilité plus ou moins grande doit être prise en considération. Nous avons dit (p. 154) que la protéine de froment (et il en est de même de la légumine) est insoluble ou très peu soluble dans l'eau, et qu'il existe une concentration minima d'acide ou d'alcali à laquelle les 2 p. c. de protéine se dissolvent complètement. Pourtant des essais au-dessous de cette limite minima et auxquels, par conséquent, la concentration de protéine était plus faible, ont été faits et enregistrés. Quant à l'acide lactique, à l'acide acétique, aux alcalis, la solubilité de la protéine augmente avec la concentration de ces matières, tandis qu'elle décroît

de nouveau très vite pour l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, aussitôt que le liquide aura pris une certaine acidité très faible (v. p. 154).

Aux essais d'acide lactique, on a ajouté une solution de protéine à 2 p. c. dans l'acide lactique à 0.05 p. c., concentration la plus faible de cet acide dans laquelle les 2 p. c. de protéine étaient complètement solubles. En ajoutant le même volume d'extrait de malt on a obtenu une solution de 0.025 p. c. d'acide lactique. On a préparé les autres concentrations en ajoutant au liquide d'essai la quantité calculée d'acide lactique.

Partout ailleurs j'ai préparé des solutions de protéine à 2 p. c. dans une concentration d'acide ou de base deux fois plus forte que celle dont il fallait se servir.

Acide lactique. (Essais nos. 567—622). Les essais sont faits en 2 séries avec des extraits de malt différents. En 10^{cc} des deux extraits, il y a 7^{mg}.96 et 9^{mg}.10 d'azote qui échappent à la précipitation par le tannin. On a encore fait des essais d'autodigestion avec le premier extrait. Température: 47°. Temps: 2 heures. Précipitation par l'acide tannique seul:

				Az dédoublé		de l'extrait de malt.
				de la solution de protéine + l'extrait de malt		
				I	II	I
p. m.				mg	mg	mg
0.00 = acide normal		au	$1/\infty$	"	"	0.72
0.25 = —	—		$1/360$	1.98	"	0.90
0.5 = —	—		$1/180$	5.04	"	"
1.0 = —	—		$1/90$	8.40	6.62	1.90
1.5 = —	—		$1/60$	"	6.74	"
2.0 = —	—		$1/45$	8.88	7.12	"
2.5 = —	—		$1/36$	"	6.46	"
3.0 = —	—		$1/30$	"	6.40	"
3.5 = —	—		$1/25.7$	"	5.84	"
4.0 = —	—		$1/22.3$	7.04	5.64	"
5.0 = —	—		$1/18$	"	"	2.80
6.0 = —	—		$1/15$	4.20	"	"
8.0 = —	—		$1/11.2$	3.86	"	"
10.0 = —	—		$1/9$	2.56	"	1.66
15.0 = —	—		$1/6$	1.52	"	"
20.0 = —	—		$1/4.5$	1.12	"	0.70

10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'eau avec 5 p. m. d'acide lactique ne montrent, au bout de 2 heures, à 47°, aucun changement à la précipitation par l'acide tannique.

Acide acétique (Essais nos. 1009—1064). 2 heures à 47°. 2 séries avec deux extraits de malt différents contenant en 10^{cc} l'un 7^{mg}.40, l'autre 5^{mg}.52 d'azote que l'acide tannique ne précipitait pas.

				Az dédoublé	
				de la solution de protéine + l'extrait de malt	
				I	II
p. m.				mg	mg
0.15 = acide normal au		$\frac{1}{400}$		1.98	"
0.2 = — — —		$\frac{1}{300}$		3.02	"
0.3 = — — —		$\frac{1}{200}$		3.62	"
0.45 = — — —		$\frac{1}{133}$		4.80	"
0.6 = — — —		$\frac{1}{100}$		6.38	"
0.9 = — — —		$\frac{1}{66.6}$		7.76	"
1.5 = — — —		$\frac{1}{40}$		8.44	7.04
3.0 = — — —		$\frac{1}{20}$		9.80	7.68
4.5 = — — —		$\frac{1}{13.3}$		"	7.52
6.0 = — — —		$\frac{1}{10}$		9.18	7.20
9.0 = — — —		$\frac{1}{6.6}$		"	6.34
12.0 = — — —		$\frac{1}{5}$		"	5.20
18.0 = — — —		$\frac{1}{3.3}$		"	3.62
30.0 = — — —		$\frac{1}{2}$		"	1.98

10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'eau avec 30 p. m. (solution normale au $\frac{1}{2}$) d'acide acétique ne changent pas au bout de 2 heures, à 47°. En 10^{cc} de solution de protéine + 10^{cc} d'extrait de malt avec de l'acide lactique à 2 p. m. 9^{mg}.22 d'azote se dédoublent au courant de 2 heures.

Acide chlorhydrique (Essais nos. 915—930). Une série, pendant 2 heures, à 47°. Des précipitations passives en 10^{cc} d'extrait + 10^{cc} de solution de protéine dans des concentrations d'acide différentes ont toutes donné le même résultat: 6^{mg}.40 d'azote se sont soustraits à la précipitation par le tannin:

						Az dédoublé	
						de la solution de protéine + l'extrait de malt	
						mg	
acide normal au		$\frac{1}{2000}$	= 0.018	p. m.	HCl	0.92	
—	—	$\frac{1}{800}$	= 0.045	—	—	1.08	
—	—	$\frac{1}{400}$	= 0.09	—	—	1.84	
—	—	$\frac{1}{200}$	= 0.18	—	—	5.24	
—	—	$\frac{1}{100}$	= 0.36	—	—	8.66	
—	—	$\frac{1}{50}$	= 0.72	—	—	2.96	
—	—	$\frac{1}{20}$	= 1.80	—	—	0.52	

Dans un essai parallèle avec de l'acide lactique à 0.2 p. c., il y a eu, pendant le même temps, dédoublement de 8^{mg}.12 d'azote.

Acide sulfurique (Essais nos. 1065—1086). L'extrait de malt contient, en 10^{cc}, 5^{mg}.42 d'azote non précipitable par le tannin:

					Az dédouble de la solution de protéine + l'extrait de malt mg	
acide normal au	$1/2000 = 0.024$	p. m. H^2SO^4		0.94	
—	$1/800 = 0.06$	—	—	1.38	
—	$1/400 = 0.12$	—	—	2.10	
—	$1/200 = 0.24$	—	—	4.42	
—	$1/150 = 0.33$	—	—	5.48	
—	$1/100 = 0.49$	—	—	7.14	
—	$1/75 = 0.65$	—	—	5.10	
—	$1/50 = 0.98$	—	—	0.06	

Hydrate de sodium. Différentes séries d'essais à des temps différents et, par conséquent, avec des extraits de malt différents. La marche des essais variant pour les différentes séries, je vais traiter chaque série à part.

1^{ère} Série (Essais nos. 1103—1119). En 10^{cc}, l'extrait de malt contient 7^{mg}.86 d'azote non précipitable par l'acide tannique. On en dose l'acidité (la teneur en sels acides + acides libres éventuels) en titrant par une solution normale d'hydrate de sodium au $1/10$, prenant comme indicateurs des papiers de tournesol et de curcuma. Abstraction faite de la valeur de cette méthode pour la détermination d'acide vraiment libre, elle fournit, telle qu'elle est appliquée ici, une mesure relative de l'acidité. Pour la neutralisation, 10^{cc} d'extrait de malt ont demandé $\left\{ \begin{smallmatrix} 2^{cc}.04 \\ 2^{cc}.02 \end{smallmatrix} \right\} = 2^{cc}.03$ de solution normale d'hydrate de sodium au $1/10$. On prépare des solutions d'hydrate de sodium contenant:

- 1) 20^{cc} de Na OH normal au $1/10$ pour 100^{cc} = Na OH normal au $1/50$
- 2) 21^{cc} - — — — —
- 3) 22^{cc} - — — — —
- 4) 23^{cc} - — — — —
- 5) 24^{cc} - — — — —
- 6) 25^{cc} - — — — — = Na OH normal au $1/40$

Dans 25^{cc} de chacune de ces solutions on a dissous à froid, en les mettant dans l'armoire glacière, 0^{gr}.5 de protéine. Sauf à la première, 10^{cc} de ces solutions devaient contenir un petit excès d'alcali

libre après avoir neutralisé 10^{cc} de l'extrait de malt. En effet, tous les mélanges ont réagi alcalin avec les papiers de tournesol et de curcuma.

10^{cc} du même extrait de malt, ajoutés à 10^{cc} de solution de protéine dans de l'acide lactique à 0.2 p. c., ont dédoublé, au bout de 2 heures, à 47°, 8^{mg}.18 d'azote les rendant imprécipitables par l'acide tannique.

Au bout du même temps les essais donnent:

						Azote dédoublé milligramme
avec 20 ^{cc} de NaOH normal au 1/10	par 100 ^{cc}				0.47
— 21 ^{cc}	— — — — —				0.44
— 22 ^{cc}	— — — — —				0.96
— 24 ^{cc}	— — — — —				0.40
— 25 ^{cc}	— — — — —				0.58

II^e Série (Essais nos. 1669—1710). Avant de servir, l'extrait de malt est neutralisé, mais par un procédé différent de celui de la série précédente. Par suite d'une préparation particulière (on digère 700^{gr} de malt avec 700^{gr} d'eau; on filtre; le lendemain, on digère de nouveau avec 230^{gr} d'eau; après filtration nouvelle, on mélange les deux filtrats) il est extrêmement riche en azote, contenant, avant la neutralisation, 23^{gr}.84 d'azote par 10^{cc}, dont 12^{gr}.08 échappent à la précipitation par l'acide tannique. A la neutralisation on se sert, comme indicateur, de phénol-phtaléine, à laquelle les phosphates primaires sont acides et les phosphates secondaires sont alcalins. Ayant trouvé qu'il faut 2^{cc}.85 d'hydrate de sodium normal au 1/10 pour la neutralisation de 10^{cc} d'extrait de malt avant de produire une teinte rouge sensible avec de la phénol-phtaléine, on a, pour éviter une dilution trop grande, neutralisé par de l'hydrate de sodium normal au 2/1 en en ajoutant 4^{cc}.25 à 300^{cc} d'extrait de malt. Dans ces conditions, un échantillon de celui-ci a donné, par l'addition de phénol-phtaléine, une teinte rouge tout justement sensible; en ajoutant encore une goutte d'hydrate de sodium au 1/10, le liquide a pris une coloration fortement rouge. A la neutralisation il s'est formé un précipité volumineux. Après filtration, on l'a digéré avec de l'eau faiblement acidulée d'acide lactique (2 p. m. d'acide lactique, à peu près) pour l'examiner à part dans le but de constater s'il possédait du pouvoir fermentatif protéolytique. En 10^{cc}, l'extrait de malt neutralisé contient 23^{mg}.12 d'azote total dont 11^{mg}.76 échappant à la précipitation par l'acide tannique.

Ici il s'est présenté un inconvénient à l'emploi de la protéine de froment: celle-ci n'est que très peu soluble dans les concentrations d'alcali, soumises à l'examen. En effet, j'ai désiré me servir de concentrations

équivalentes aux concentrations correspondantes d'acides minéraux, acide chlorhydrique et acide sulfurique, qui font l'objet des essais précédents (v. p. 207—08). J'ai donc choisi une autre matière protéique, la *légumine*, qui s'est montrée un peu plus soluble, sachant, grâce à une série particulière d'essais (v. IV, 3), qu'elle est susceptible d'une action vigoureuse de l'extrait de malt en solution acide. On a préparé différentes solutions de légumine à 2 p. c. dans des solutions d'hydrate de sodium de concentrations différentes: des solutions normales au $\frac{1}{800}$, au $\frac{1}{400}$, au $\frac{1}{200}$, au $\frac{1}{100}$, au $\frac{1}{75}$, au $\frac{1}{50}$, au $\frac{1}{20}$, au $\frac{1}{10}$. Pour accélérer la solution, on chauffe au bain-marie pendant une heure. La légumine ne se dissolvant pas complètement dans les six premières concentrations, leur teneur en azote est moins forte que celle des solutions suivantes, tout en augmentant avec les concentrations d'hydrate de sodium. On sépare la matière indissoute par filtration. Les trois dernières solutions avaient une teinte jaunâtre. Par le mélange avec des volumes égaux d'extrait de malt, les concentrations d'hydrate de sodium sont réduites de moitié donnant des solutions normales au $\frac{1}{1600}$, au $\frac{1}{800}$, etc. — A titre de comparaison on a fait des essais sur l'influence de l'extrait de malt sur une solution de légumine acidulée d'acide lactique (à 2 p. m. d'acide lactique); mais en mêlant les deux liquides, une partie de la légumine s'est précipitée. — L'acide tannique a servi de précipitant. On a fait des précipitations passives dans des mélanges de 10^{cc} d'extrait de malt et 10^{cc} des solutions suivantes: 1° de la légumine dans de l'acide lactique à 0.2 p. c.; 2° de la légumine dans de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{800}$; 3° de la légumine dans de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{200}$. Les liquides filtrés en contenaient 11^{mg}.54, 11^{mg}.08, 10^{mg}.84 d'azote. Température 47°. Temps d'essai 2 heures. En voici les résultats:

							Az dédoublé milligrammes
10 ^{cc} de malt + 10 ^{cc} de légumine dans de l'ac. lactique à 2 p.m. donnent							12.44
—	—	—	—	—	du NaOH normal	au $\frac{1}{1600}$	— 1.28
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{800}$	— 1.48
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{400}$	— 1.58
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{200}$	— 1.60
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{150}$	— 1.54
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{100}$	— 1.16
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{40}$	— (6.72)
—	—	—	—	—	—	— $\frac{1}{20}$	— (12.80)

On a trouvé les chiffres de l'azote dédoublé en déduisant des quantités d'azote trouvées aux liquides filtrés des essais actifs 10^{mg}.96, moyenne

des deux précipitations passives, nommées plus haut. Les chiffres élevés des deux derniers essais avec l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{40}$ et au $\frac{1}{20}$ s'expliquent, sans doute, par le dédoublement de la légumine sous l'influence des concentrations fortes alcalines. Ce dédoublement, qui a lieu probablement déjà pendant le chauffage, fait qu'une grande partie de la légumine échappe à la précipitation par le tannin. Probablement il n'y pas d'action d'enzyme du tout, mais c'est là un point sur lequel ces essais ne permettent aucune conclusion sûre. Les résultats des autres essais nous montrent clairement que la présence de petites quantités d'alcali libre cause l'affaiblissement prononcé, peut-être la destruction complète du pouvoir fermentatif. Pour s'éclaircir sur la nature de cette influence, et pour apprendre si l'hydrate de sodium détruit l'enzyme ou s'il ne fait qu'en entraver l'action, on a fait, avec le même extrait de malt, les essais suivants:

1° Avec l'extrait de malt sans neutralisation contenant 23^{mg}.84 d'azote et qu'on fait agir sur une solution de légumine dans de l'acide lactique. Au bout de 2 heures, à la température de 47°, 18^{mg}.28 d'azote se sont dédoublés.

2° Avec l'extrait de malt neutralisé provisoirement (indicateur: de la phénol-phtaléine) par l'hydrate de sodium à réaction faiblement alcaline, mais rendu acide, tout de suite après, au moyen de la quantité d'acide lactique correspondant à l'hydrate de sodium additionné. Sous son action, 15^{mg}.58 d'azote d'une solution de légumine dans de l'acide lactique se sont dédoublés.

3° Avec l'extrait de malt neutralisé la veille et placé, jusqu'au moment de s'en servir, dans l'armoire glacière. On y ajoute de l'acide lactique en quantité correspondante à l'hydrate de sodium additionné. Sous son action 11^{mg}.44 d'azote d'une solution de légumine dans de l'acide lactique se sont dédoublés.

4° Avec l'extrait à acide lactique du précipité (v. p. 209) formé à la neutralisation de l'extrait de malt. En 10^{cc} de cette eau il y avait 2^{mg}.25 d'azote total. En la faisant agir sur une solution de légumine dans de l'acide lactique on a obtenu 1^{mg}.00 d'azote dédoublé.

Il résulte de ces essais que la neutralisation provisoire d'un extrait de malt, tout en affaiblissant son pouvoir fermentatif tryptique, est loin de le détruire; qu'après 24 heures de neutralisation le pouvoir fermentatif s'est affaibli ultérieurement, mais qu'il est toujours assez vigoureux si on rétablit la réaction acide; enfin, que le précipité formé à la neutralisation et qui consiste essentiellement en phosphates, entraîne une substance douée d'un pouvoir fermentatif faible, ce qui contribue

à l'affaiblissement du pouvoir fermentatif de l'extrait de malt qu'on constate à la neutralisation.

III^e Série (Essais nos. 2091—2099, 2109—2122, 2135—2144). On neutralise l'extrait de malt comme à la série précédente se servant, comme indicateur, de la phénol-phtaléine. A un essai provisoire, pour produire la teinte rougeâtre à 10^{cc}, on emploie $\left\{ \begin{smallmatrix} 3^{cc.08} \\ 3^{cc.00} \end{smallmatrix} \right\}$ de solution d'hydrate de sodium normale au $\frac{1}{10}$. On ajoute alors à 300^{cc} d'extrait de malt 9^{cc} d'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{1}$. Après la filtration du précipité formé, l'extrait neutralisé contient, en 10^{cc}, 18^{mg}.66 d'azote total. On prépare les solutions de légumine la veille, à froid, mais on les chauffe, avant l'essai, pendant 1 heure au bain-marie en ébullition. On réussit à obtenir une dissolution un peu plus complète de la légumine qu'à la série précédente: dans les solutions d'hydrate de sodium normales au $\frac{1}{500}$ et au $\frac{1}{200}$ seules, des quantités notables en restent indissoutes; dans l'hydrate normal au $\frac{1}{100}$ une trace¹⁾. A tous ces essais on filtre avant l'usage. On n'emploie que des solutions normales au $\frac{1}{500}$, au $\frac{1}{200}$, au $\frac{1}{100}$, au $\frac{1}{50}$, au $\frac{1}{25}$. En les mêlant avec des volumes égaux d'extraits de malt on en réduit la force de moitié (solutions normales au $\frac{1}{1000}$, au $\frac{1}{400}$, etc.).

Voici les dosages faits avant les essais (expériences passives):

10^{cc} de légumine dissous dans de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{500}$ + 10^{cc} d'extrait de malt, ce qui produit une concentration de liqueur alcaline normale au $\frac{1}{1000}$, donnent, dans le liquide filtré, 15^{mg}.50 d'azote en précipitant par le chlorure stanneux, et 9^{mg}.48 en précipitant par l'acide tannique.

10^{cc} de légumine dissous dans de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{100}$ contenant 31^{mg}.84 d'azote total, donnent dans le liquide filtré, après l'addition de 10^{cc} d'extrait de malt, 15^{mg}.72 d'azote en précipitant par le chlorure stanneux, et 9^{mg}.32 d'azote en précipitant par l'acide tannique.

10^{cc} de légumine dans de l'acide lactique à 0.4 p. c. + 10^{cc} d'extrait de malt neutralisé donnent, au liquide filtré, 15^{mg}.72 d'azote en précipitant par le chlorure stanneux, et 10.^{mg}00 en précipitant par l'acide tannique.

La même solution de légumine + 10^{cc} d'extrait de malt non neutralisé mais porté, par l'addition d'eau, au même volume que l'extrait neutralisé d'alcali donnent, au liquide filtré, 17^{mg}.32 d'azote à la précipitation par le chlorure stanneux, et 10^{mg}.40 d'azote par l'acide tannique.

Voici les résultats des essais actifs faits pendant 2 heures, à 50°:

¹⁾ La solubilité si différente de celle de l'autre série s'explique peut-être par l'emploi d'une autre préparation de légumine.

		Azote dédoublé au liquide filtré	
		du chlorure stann. de l'acide tann.	
Extr. de malt neutralisé	solut. de + légumine	milligrammes	milligrammes
		dans NaOH norm. au 1/1000	
—	—	—	2.17
—	—	1/400	4.89
—	—	1/200	5.55
—	—	1/100	4.45
—	—	1/50	3.73
—	—	— de l'ac. lactique à 2 p. m.	9.02
Extr. de malt non neutralisé.	—	—	18.08
			17.10

Carbonate de sodium neutre (Na^2CO^3). (Essais nos. 2100—2108, 2123—2134, 2145—46). On a fait ces essais en se servant du même extrait de malt qu'aux essais de la III^e Série sur l'hydrate de sodium, et parallèlement à cette série. Les solutions de légumine sont préparées de la même façon, si ce n'est qu'on emploie, comme dissolvant, le carbonate de sodium. Je pars d'une liqueur titrée normale au $\frac{1}{10}$ = 0.53 p. c. Celle-ci donne, avec du nitrate d'argent, un précipité jaunâtre sans la moindre trace de nuance brunâtre, ne contenant, par conséquent, aucun hydrate de sodium libre. Pour reconnaître si la solution contient du bicarbonate de sodium (NaHCO^3), on ajoute à 10^{cc} de solution 2, 3, 4 gouttes d'une solution titrée normale d'hydrate de sodium au $\frac{1}{10}$, puis une goutte de nitrate d'argent. La teinte brune d'oxyde d'argent ne paraît qu'à l'essai des 3 gouttes d'hydrate de sodium; à l'essai des 2 gouttes, il n'y a aucune trace de nuance brunâtre. Nous mettons 10^{cc} égaux à 200 gouttes. Le carbonate neutre ne contient, par conséquent, qu'environ 1 p. c. de bicarbonate de sodium. On emploie les mêmes concentrations qu'aux essais avec l'hydrate de sodium: ainsi donc du carbonate de sodium neutre normal au $\frac{1}{500}$, au $\frac{1}{200}$, au $\frac{1}{100}$, au $\frac{1}{50}$, au $\frac{1}{25}$, au $\frac{1}{10}$, en réduisant de moitié par l'addition de l'extrait de malt au $\frac{1}{1000}$, au $\frac{1}{400}$, au $\frac{1}{200}$, etc. La légumine est ici un plus soluble que dans l'hydrate de sodium.

Voici combien on a trouvé d'azote aux liquides filtrés avant les essais (des expériences passives):

En 10^{cc} de solution de légumine dans Na^2CO^3 normal au $\frac{1}{500}$ + 10^{cc} d'extrait de malt, on a eu, dans le liquide filtré, en précipitant par le chlorure stanneux, 15^{mg}.10 d'azote, en précipitant par l'acide tannique, 9^{mg}.36 d'azote.

10 ^{cc}	dans du Na^2CO^3	normal au $\frac{1}{100}$	contiennent	31 ^{mg} .20	d'Az total
—	—	—	—	1/10	—
				33 ^{mg} .36	—

10^{cc} de solution de légumine dans du Na^2CO^3 normal au $\frac{1}{100}$ + 10^{cc} d'extrait de malt donnent, dans le liquide filtré, en précipitant par

le chlorure stanneux, 15^{mg}.04 d'azote, en précipitant par l'acide tannique, 9^{mg}.40 d'azote. Les expériences correspondantes avec du Na²CO³ normal au 1/10 donnent 16^{mg}.00 et 8^{mg}.60 d'azote (Comp. les chiffres pour le NaOH normal au 1/10, p. 213).

Pour les expériences parallèles avec les solutions de légumine dans l'acide lactique v. p. 213.

Voici les résultats des essais actifs, faits pendant 2 heures, à 50°.

					Azote dédoublé au liquide filtré		
					du chlorure stann. de l'acide tann.		
					milligrammes	milligrammes	
Extrait de malt + solution de légumine dans du Na ² CO ³ norm. au 1/1000					3.65	1.98	
—	—	—	—	—	1/400	5.13	1.94
—	—	—	—	—	1/200	4.41	1.62
—	—	—	—	—	1/100	4.21	1.18
—	—	—	—	—	1/50	4.03	0.38

Les résultats principaux obtenus aux essais sur l'influence des acides et des alcalis sur la protéolyse, sont montrés graphiquement au moyen des courbes de la planche XI. Les abscisses indiquent les concentrations des différentes substances, exprimées en solutions titrées normales (millièmes de grammes-équivalents par litre), et les ordonnées la quantité d'azote en milligrammes qui s'est soustraite, pendant le temps de l'essai, 2 heures, à la précipitation par l'acide tannique, à la température optima de 47°. On pourra dresser des courbes pareilles pour l'activité que révèle la précipitation par le chlorure stanneux, mais ce n'est que par exception que mes essais ont été poussés aussi loin. — Il faut, cependant, accentuer, ce que j'ai dit plus haut, que les courbes, rapprochées sur la Pl. XI, ne sont pas directement comparables, en tant qu'elles expriment les résultats d'essais faits avec des extraits de malt divers et, en partie, avec des matières albuminoïdes diverses. On ne peut donc pas conclure de la place plus élevée d'une courbe que l'acide correspondant est plus favorable à la protéolyse qu'un autre acide dont la courbe se trouve plus bas.

En examinant la marche des courbes on trouve un certain accord entre les deux acides minéraux d'un côté et les deux acides organiques de l'autre, ainsi qu'un certain parallélisme entre l'action des deux alcalis. Chose frappante dans les deux premières courbes: les grandes variations de l'action sont causées par des variations insignifiantes de l'acidité. On verra qu'une petite négligence dans l'essai aura facilement pour effet de faire échapper à l'observateur l'influence de ces acides. Toutes les deux paraissent avoir atteint l'optimum quand le liquide à essayer

a une teneur en acide égale à celle d'une solution acide normale au $1/100$ à peu près ou, pour l'acide chlorhydrique, à environ 0.36 p. m., pour l'acide sulfurique à environ 0.49 p. m. (comp. l'effet de l'acide chlorhydrique sur la pepsine, auquel cas l'optimum est mis à 2—4 p. m.). Toute action a cessé, pour l'acide chlorhydrique, à l'acidité égale à celle d'une liqueur acide normale au $1/20$ ($= 1.8$ p. m.), pour l'acide sulfurique à l'acidité d'une liqueur acide normale au $1/50$ ($=$ environ 1 p. m.).

L'optimum des deux acides organiques paraît se trouver à un point d'acidité égal à l'acidité de liqueurs acides normales au $1/50$ et au $1/20$ à peu près, c'est à dire ils ont une teneur en acide de 2 p. m. et de 3 p. m. respectivement, pour l'acide acétique sans variation notable entre 2 et 6 p. m. Mais ces substances permettent des concentrations relativement élevées, de sorte que l'action protéolytique reste sensible, pour l'acide lactique, encore à une acidité égale à celle d'une liqueur acide normale au $1/4.5$ ($= 20$ p. m.), et, pour l'acide acétique, encore à une acidité égale à celle d'une liqueur acide normale au $1/2$ ($= 30$ p. m.). Les dernières sections des courbes n'ont trouvé aucune place sur la planche, mais il sera facile de les construire sur une plus petite échelle d'après les chiffres des tableaux.

L'accroissement rapide des quatre courbes jusqu'à l'acidité d'une liqueur acide normale au $1/100$ est particulièrement caractéristique aux quatre acides, qui tous y montent ensemble.

Les deux alcalis semblent s'être bornés à retarder l'activité tryptique. Leur influence dans ce sens paraît s'agrandir avec la force des concentrations. Dans les concentrations les plus faibles l'enzyme a encore une action faible, mais déjà si l'alcalinité de la solution est égale à celle d'une liqueur alcaline normale au $1/50$, la protéolyse s'est complètement arrêtée. Cependant on constate un accroissement faible pour l'action mise à nu à la précipitation par le chlorure stanneux en allant de la liqueur alcaline normale au $1/1000$ à la liqueur alcaline normale au $1/400$ (v. les tableaux pp. 213 et 214). De là, il n'y a aucun accroissement ultérieur, mais, d'autre part, il n'y a pas non plus de descente rapide: les courbes passent presque parallèlement à l'axe des abscisses jusqu'à ce qu'on ait atteint l'alcalinité d'une liqueur alcaline normale au $1/50$ à peu près. En somme, la conclusion qu'il faut tirer des essais cités est la suivante: la réaction alcaline exerce un effet retardateur sur le dédoublement tryptique des deux substances albuminoïdes examinées (la protéine de froment et la légumine). D'après Windisch et Schellhorn¹⁾, elle favorise la

¹⁾ Windisch und Schellhorn: Wochenschr. f. Brauerei, XVII. Jahrg., 335 (1900).

protéolyse de substances albuminoïdes animales (la gélatine). C'est une question sur laquelle je ne me prononcerai pas. Dans un cas singulier que j'ai soumis à l'examen (l'influence sur la fibrine de bœuf dans une solution de carbonate de sodium à 0.135 p. c. (liqueur alcaline normale au $\frac{1}{40}$, à peu près)), à quelques petites traces près, il ne s'est montré, même au bout de 24 heures, ni dédoublement pepsique ni dédoublement trypsique; mais, cela va sans dire, on n'est pas en droit de généraliser en partant d'un essai isolé à une seule concentration d'alcali (v., du reste, plus loin IV, 3). —

Quoiqu'il y ait, à ce qu'il semble, une différence remarquable entre l'influence sur la protéolyse des deux acides organiques, d'un côté, et des deux acides minéraux, de l'autre, surtout après que l'action aura atteint l'optimum, il est possible, je crois, d'en donner l'explication, qui fera comprendre, en même temps, le mode d'action des alcalis, ainsi que l'ont fait Fernbach et Hubert dans leur notice déjà citée¹). Il est regrettable que ces deux auteurs ne donnent ni chiffres pour les résultats de leurs essais ni renseignements détaillés de leur procédé expérimental, se bornant à émettre les assertions suivantes, à peu près: Si un extrait de malt agit fermentativement en amenant soit la saccharification soit la protéolyse, c'est son contenu de phosphates primaires qui en accélère l'action, tandis que les phosphates secondaires la retardent. Un malt préparé à froid contient toujours un mélange de ces deux phosphates: „Or, la réaction de l'extrait de malt, acide à la phtaléine, alcaline au méthylorange est celle qu'aurait un mélange de phosphates primaire et secondaire d'un métal alcalin.“ L'addition d'acides et d'alcalis exerce son action en changeant les phosphates secondaires en phosphates primaires, et vice versa. Pour cette raison, les acides exercent un effet accélérant jusqu'à une certaine limite, tandis que les alcalis ont toujours un effet retardateur. Mais l'influence favorable des acides ne s'étend qu'au point où tout phosphate secondaire est changé en phosphate primaire, c'est à dire jusqu'à la réaction neutre au méthylorange. Toute addition ultérieure d'acide libre a un effet retardateur sur les enzymes. De même, l'addition d'alcali n'arrêtera pas toute action diastasique tant qu'il reste encore des phosphates primaires, mais elle aura une influence retardatrice en changeant ceux-ci en phosphates secondaires et en sels ordinaires. Les sels qui transforment les phosphates comme le font les acides et les bases, exerceront le même effet que ceux-ci.

Or, la différence entre les acides organiques et les acides minéraux c'est que, grâce à leur dissociation plus avancée, ces derniers ont une

¹) Fernbach et Hubert: C. r. CXXXI, 293 (1900).

action beaucoup plus énergique pour décomposer les phosphates secondaires que les premiers. Il était donc d'importance d'examiner si ces indications et les lois que j'ai trouvées pour l'influence des alcalis et des acides s'accordent entre elles. S'il en était ainsi, l'addition à un extrait de malt de la quantité d'acide assez grande pour provoquer une réaction neutre au méthylorange (c'est à dire jusqu'à ce que tous les phosphates secondaires soient changés en phosphates primaires) doit indiquer justement l'optimum de l'effet de cet acide.

J'ai donc préparé un extrait de malt comme à l'ordinaire, le titrant par de l'acide chlorhydrique normal au $\frac{1}{10}$, de l'acide sulfurique normal au $\frac{1}{7}$, de l'acide acétique normal au $\frac{1}{1}$, de l'hydrate de sodium normal au $\frac{1}{10}$. Comme indicateurs, je me suis servi du méthylorange pour les acides, et de la phénol-phtaléine pour l'alcali. Dans ces déterminations je n'ai pas visé à l'exactitude rigoureuse, qui aussi serait illusoire, vu les différences individuelles des extraits de malt par rapport aux phosphates primaires et secondaires. Mais les résultats permettent parfaitement bien d'élucider la question.

J'ai dosé 10^{cc} d'extrait de malt, additionné de quelques gouttes de méthylorange y produisant une teinte jaune-foncé, par les acides indiqués ci-dessus. Les quantités d'acides ajoutées aux différents échantillons de l'extrait étaient de 0^{cc}.5, 1^{cc}, 1^{cc}.5, 2^{cc}, 2^{cc}.5, 3^{cc}, 3^{cc}.5. J'ai cherché à déterminer la quantité à laquelle apparaît la première nuance rougeâtre, ce que, cependant, en quelques cas, on décide le mieux au bout de quelque temps de repos, après que le précipité se sera déposé. La coloration rougeâtre a apparu après l'addition de

2^{cc} d'acide chlorhydrique normal au $\frac{1}{10}$

1^{cc}.5 — sulfurique — - $\frac{1}{7}$ = 2^{cc} d'acide normal au $\frac{1}{10}$

1^{cc}.0 — acétique — - $\frac{1}{1}$ = 10^{cc} — — - $\frac{1}{10}$

Pour l'acide acétique, elle n'était pas bien distincte et, aux quantités plus fortes, les transitions n'étaient que très peu prononcées.

Pour donner à 10^{cc} d'extrait de malt, auquel on a additionné quelques gouttes de phénol-phtaléine, une nuance rougeâtre, il a fallu employer

$\left. \begin{array}{l} 2^{\text{cc}}.7 \\ 2^{\text{cc}}.8 \end{array} \right\} = 2^{\text{cc}}.75$ de solution d'hydrate de sodium normale au $\frac{1}{10}$.

Nous voyons de ces déterminations que cet extrait de malt contenait un peu plus de phosphate primaire que de phosphate secondaire, en tout la quantité correspondant à 4^{cc}.8 de liqueur titrée normale au $\frac{1}{10}$. Pour tout changer en phosphate primaire, il fallait 2^{cc} d'acide chlorhydrique

au $\frac{1}{10}$, 2^{cc} d'acide sulfurique titré normal au $\frac{1}{10}$, et environ 10^{cc} d'acide acétique titré normal au $\frac{1}{10}$. Si on avait distribué les mêmes quantités d'acides sur 20^{cc} de liquide, les concentrations d'acide auraient été, pour les deux premiers, des acides normaux au $\frac{1}{100}$, pour l'acide acétique, l'acide normal au $\frac{1}{10}$. C'est à ces concentrations, justement, que nous trouvons l'action la plus grande, ou à peu près, de ces acides (v. Pl. IX). Au-delà de ces concentrations, l'action de l'acide chlorhydrique et de l'acide sulfurique descend rapidement, celle de l'acide acétique, au contraire, très doucement.

En ajoutant à 10^{cc} d'extrait de malt 2^{cc}.75 de liqueur d'hydrate de sodium normale, tous les phosphates primaires sont changés en secondaires. S'il fallait transformer ceux-ci en phosphates normaux, il faudrait encore ajouter 4^{cc}.8 de liqueur alcaline normale au $\frac{1}{10}$. Pour mes essais (v. p. 212, III^e série, et p. 213—14, Carbonate de sodium), je suis parti d'un extrait de malt neutralisé; par conséquent, 20^{cc} de liquide (dont 10^{cc} d'extrait de malt) contenant 4^{cc}.8 de liqueur alcaline normale au $\frac{1}{10}$ donneront au liquide l'alcalinité d'une liqueur alcaline normale au $\frac{1}{42}$ environ. Les essais font constater qu'une liqueur alcaline normale au $\frac{1}{50}$ ne produit qu'une action protéolytique très faible. Si on prolongeait les courbes, que j'ai trouvées, de l'influence de l'hydrate et du carbonate de sodium, elles couperaient l'axe des abscisses à la liqueur alcaline normale au $\frac{1}{40}$, c'est à dire là où la teneur en alcali du liquide dépasse la quantité correspondant au phosphate normal.

Considérant cet accord entre les résultats de mes essais et l'explication de Fernbach et Hubert, je ne doute pas que celle-ci ne soit essentiellement exacte, et je suis d'avis qu'elle pourra, au plus haut degré, servir à nous faire comprendre le rapport entre les actions diastasiques et les acides en général. En effet, la plupart des préparations d'enzymes contiennent, sans doute, des phosphates qui, d'après ces données, joueront un rôle très important aux actions diastasiques.

Alcool.

On prépare des solutions à 2 p. c. de protéine dans de l'alcool à 1, 3, 5, 10, 20 degrés pondéraux avec la quantité ordinaire d'acide lactique (0.4 p. c.). En ajoutant des volumes égaux d'extrait de malt, les concentrations seront réduites à 0.5, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 p. c. Pour empêcher que des vapeurs d'alcool ne s'échappent pendant les essais, on bouche les fioles d'un bouchon percé d'où monte un tube de verre étroit, long de 40^{cm}, fermé d'une goutte d'eau. Temps des essais: 2 heures, à la température de 47°. L'acide tannique seul sert de précipitant. Voici les résultats obtenus:

Avec 0 p. c. d'alcool	11.25	milligrammes d'Az	dédoublé	} différence 3.74
— 0.5 - —	11.05	—	—	
— 1.5 - —	10.65	—	—	
— 2.5 - —	9.69	—	—	
— 5.0 - —	7.51	—	—	} — 3.66
— 10.0 - —	3.85	—	—	

Ainsi l'addition d'alcool est toujours retardatrice, et l'effet en est presque proportionnel à la quantité d'alcool. La courbe dressée au moyen des chiffres ci-dessus (Pl. XII) forme une ligne parfaitement droite; si on la prolongeait, elle couperait l'axe des abscisses à 15 p. c. d'alcool, à peu près; c'est à dire que l'enzyme cesserait, à ce point, toute action, conclusion que, naturellement, il ne faudra tirer sans contrôler par des essais directs.

Antiseptiques.

On part souvent de la supposition erronée qu'on pourra distinguer une action purement diastasique d'une action purement physiologique en ajoutant un antiseptique qui, tout en laissant intacte l'enzyme isolée de la cellule vivante, tuerait les cellules productrices de l'action physiologique. Mais souvent les substances qu'on introduit ne sont pas même des antiseptiques proprement dits. D'autre part, il y a lieu de croire que beaucoup d'enzymes sont tout aussi sensibles vis-à-vis de certains antiseptiques que la cellule vivante. Le fait est que toute généralisation est impossible ici. Tout comme il y a des poisons spécifiques pour les cellules vivantes diverses, il y en a aussi pour les enzymes diverses. Il est difficile, en ce moment, de démontrer l'existence de lois pour ces faits, de même que l'action de la plupart des poisons est énigmatique.

Les résultats négatifs auxquels arrivent quelquefois ceux qui étudient les enzymes ou qui cherchent à en démontrer l'existence, s'expliqueront, sans doute, souvent par l'emploi de quelque antiseptique qui prévient l'action de l'enzyme en question. C'est une chose que devrait noter l'enzymologie future. Dans le cas, précisément, que nous allons étudier, on aura l'exemple de la plus grande sensibilité vis-à-vis de quelques-uns des antiseptiques les plus communs aux recherches des enzymes, jointe à une impassibilité frappante en face d'autres antiseptiques.

On comprendra de ce qui précède qu'après avoir fait l'expérience de l'influence retardatrice sur quelques enzymes, j'en suis vite venu à faire mes essais de peu de durée sans addition d'antiseptique. Une observation faite par hasard m'a conduit, plus tard, à étudier particulière-

ment l'influence du toluol, et des considérations purement théoriques m'ont engagé, en partie, à faire du formol le sujet de recherches spéciales. Ce que j'ai à communiquer là-dessus est assez fragmentaire; une partie en a été publiée avant¹⁾. Cependant j'ai plusieurs observations nouvelles et non pas dépourvues d'intérêt à soumettre.

Voici ma première observation: un extrait de malt laissé, pendant 7 jours, à 0°. dans un seau à glace et saturé de thymol, dont 1 p. c. au plus est soluble, avait tout à fait perdu son pouvoir fermentatif tryptique, quoique, autrement, il fût absolument clair, et sentit bon. D'autres essais (v. p. 152) m'ont appris qu'au contraire, des extraits de malt placés de même à 0°, mais sans addition aucune, conservaient leur pouvoir fermentatif presque entier pendant le même espace de temps. J'ai alors examiné, dans une série d'essais (essais nos. 519—534) simultanés l'action de divers antiseptiques. Au bout de 2 heures, à 47°, j'ai obtenu des composés non précipitables par l'acide tannique comme suit:

				diminution
sans antiseptiques.....	9.96	milligrammes d'Az	„	
saturé de thymol	6.72	—	—	3.24
— - chloroforme	5.82	—	—	4.14
avec 1 p. c. de formol.....	3.20	—	—	6.76
— 1 — d'acide benzoïque..	2.16	—	—	7.80
— 1 — — salicylique..	0.92	—	—	9.04

L'influence retardatrice de ces deux derniers corps, qui ne sont pas des antiseptiques très énergiques, tient, sans doute, à ce qu'ils ont provoqué une précipitation au liquide laquelle probablement a entraîné la plupart des enzymes; peut-être aussi ont-ils transformé la protéine en un corps non fermentescible. En effet, des essais de brassage, dans lesquels je n'entrerai pas ici²⁾, ont fait preuve d'une protéolyse fortement activée par l'addition d'acide salicylique à 0.2 p. c. dans des circonstances où celui-ci a clairement agi en sa qualité d'acide, y étant en quantité trop petite pour jouer le rôle d'un précipitant. Mais on voit que le thymol, aussi bien que le chloroforme et que, surtout, le formol, ont eu un effet très retardateur sur la protéolyse.

J'ai encore fait des recherches spéciales sur la manière dont se comporte la protéolyse par rapport au formol et au toluol.

Formol. J'emploie la solution de formol ou de formaline du commerce contenant environ 40 p. c. d'aldéhyde formique.

¹⁾ Fr. Weis: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI, 84 (1900).

²⁾ Voir Fr. Weis: ibid. p. 92—93.

I^{ère} Série (Essais nos. 549—566). L'objet de ces essais est de rechercher l'influence de doses différentes. Pour que le formol ne s'échappe pas, les fioles sont pourvues de bouchons. Voici quel est le dédoublement d'azote (c'est à dire la quantité d'azote échappant à la précipitation par l'acide tannique) qui a eu lieu au bout de deux heures, à 47°:

	milligrammes d'Az
Sans formol.....	10.16
par l'addit. de 1 goutte ¹⁾ de formol = env. 0.05 p. c. d'aldéhyde formique	6.28
— - 2 — — = - 0.10 — — —	6.34
— - 4 — — = - 0.20 — — —	4.96
— - 6 — — = - 0.30 — — —	4.16
— - 8 — — = - 0.40 — — —	3.82
— - 10 — — = - 0.50 — — —	3.12
— - 12 — — = - 0.60 — — —	2.54

Ce qui est surprenant c'est l'effet énorme de l'addition de 0.05 p. c. d'aldéhyde formique (v. la courbe la plus basse de la planche XII). —

II^e Série (Essais nos. 535—548). L'objet de ces essais est la recherche de la vitesse avec laquelle agit une certaine quantité, en ce cas-ci 1 p. c., de formol (= 0.4 p. c. d'aldéhyde formique). En effet, il est possible que toute action fermentative s'arrête au bout d'un certain temps par suite de la décomposition de toute enzyme; il est possible aussi qu'une partie de l'enzyme reste intacte pendant toute la durée de l'expérience. Seul précipitant: l'acide tannique. Température de 47°:

	Sans formol milligrammes	Avec du formol milligrammes
Au bout de 1/2 heure il y a 3.82 d'Az dédoublé	1.12 d'Az dédoublé	
— - 1 — — , —	2.14 —	
— - 2 heures — 10.16 —	2.46 —	

Ces résultats semblent indiquer que la quantité totale d'enzyme a été détruite successivement et que l'extrait de malt, grâce à 1 p. c. de formol, aura perdu tout pouvoir fermentatif au bout d'une heure (v. cependant Essais p. 224). — Il serait intéressant d'examiner si l'extrait pourra reprendre son pouvoir fermentatif, si on en chasse tout le formol par la chaleur. J'aurais été disposé à répondre par la négative si, au sujet d'autres enzymes, la littérature ne donnait des indications dans le sens contraire.

¹⁾ 1^{cc} contient 40 de ces gouttes. Comme à l'ordinaire, le liquide à essayer consiste en 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine.

Suivant Benedicenti¹⁾, différentes substances albuminoïdes (fibrine, sérum du sang, caséine, ovalbumine, gélatine), soumises à l'action prolongée d'aldéhyde formique, subissent, entre autres changements, celui de devenir indigestibles tant à la pepsine qu'à la trypsine, l'aldéhyde formique se réunissant à ces corps pour former des composés nouveaux. En chauffant dans un courant de vapeur, on pourra l'en séparer de nouveau, les substances protéiques reprenant ainsi leurs propriétés primitives. Des auteurs postérieurs ont trouvé, cependant, que, quant à la pepsine, l'aldéhyde ne fait qu'en retarder l'action, sans l'arrêter complètement. Et récemment Leo Schwarz („Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden“)²⁾ est venu confirmer cette manière de voir. Il fait agir l'aldéhyde formique en petite quantité („quelques gouttes d'une solution de formol“) et en des temps divers (de „sehr kurz bis 2 Monate“) sur des albuminoïdes du sérum. Il se forme de la sérumalbumine de méthylène contenant relativement plus de carbone et moins d'azote que la sérumalbumine primitive et ne coagulant plus à l'ébullition. Il soumet ce corps à une digestion partie avec de la pepsine + de l'acide chlorhydrique, partie avec de la trypsine + du carbonate de sodium; à titre de contrôle il laisse agir les mêmes enzymes sur des filaments fibrineux. Comme criterium de la digestion, il se sert de la réaction du biuret. Mais qu'il se servît de préparations contenant de l'aldéhyde libre ou non les essais avec la trypsine ne donnaient jamais la réaction du biuret, pas même au bout de 24 heures, tandis que les essais avec la pepsine montraient toujours cette réaction au bout de très peu de temps. Schwarz en conclut que l'aldéhyde formique transforme l'albumine de manière à la rendre inattaquable par la trypsine (mais non pas par la pepsine). A ce propos il cite Bliss et Novy qui, ayant fait des recherches systématiques sur l'influence de l'aldéhyde formique sur les enzymes, déclarent que la trypsine se détruit facilement tandis que la pepsine résiste, pendant des semaines, à jusqu'à 5 p. c. d'aldéhyde formique — encore un exemple de la réaction spécifique des antiseptiques divers sur les enzymes.

Ces données m'ont conduit à faire des recherches analogues sur l'action de l'aldéhyde formique sur la protéine de froment et les extraits de malt. Voici ces essais:

III^e Série (Essais nos. 1955 a—1962 a, 1981—1994). Le 2 avril 1901, j'ai placé dans un lieu tranquille deux fioles contenant chacune 100^{cc} d'une solution de protéine (2 p. c.) dans une solution d'acide

1) A. Benedicenti: Arch. für Anat. u. Physiol. Phys. Abt., p. 219 (1897).

2) Leo Schwarz: Zeitschr. für physiol. Chemie XXXI, 460 (1901).

lactique. L'une d'elles à laquelle on avait ajouté 2 p. c. de formol, est fermée d'un bouchon de liège. L'autre, exempte de formol, est stérilisée en la chauffant au bain-marie en ébullition, et pourvue d'un bouchon de coton. Toutes les deux, soumises à la température ambiante, restent parfaitement limpides. — Le 3 mai, à 3 heures du soir, deux parties du même extrait frais de malt ont été placées dans l'armoire glacière; à l'une on a ajouté 2 p. c. de formol, à l'autre rien. Le lendemain l'échantillon au formol présentait une teinte opalisante, étant d'une nuance un peu plus claire (évidemment le formol avait détruit les oxydases) que l'autre, resté parfaitement translucide et gardant son odeur fraîche. Le 4 mai, on a fait les essais en mêlant les différents échantillons (v. plus loin). Pour être court, on désignera dans la suite l'extrait de malt contenant du formol par edm. +, celui qui n'en contient pas par edm. ÷ et, d'une manière analogue, les solutions de protéine par prot. + et prot. ÷. Pendant les essais actifs, qui duraient 1 heure 45 minutes, à 50°, des différences caractéristiques se sont manifestées entre les essais avec et sans formol. Dans le premier cas, il y avait formation d'un coagulum abondant ou d'un précipité en croûte; dans l'autre cas, il n'y avait ni coagulum, ni précipité. Nous indiquerons, dans une colonne à part, ces différents phénomènes par les signes: + C, + P, ÷ C, ÷ P. On s'est servi, comme précipitants, tant du chlorure stanneux que de l'acide tannique. L'extrait de malt contenait, en 10^{cc}, 21^{mg}.04 d'azote total dont 13^{mg}.64 avaient échappé à la précipitation par le chlorure stanneux, 11^{mg}.08 à celle par l'acide tannique. Cet extrait était d'une action très énergique.

	Phénomène de coagulation	Az du liq. filtré du chlorure stanneux	Az dédoublé	Az du liq. filtré de l'acide tannique	Az dédoublé
		mg.	mg.	mg.	mg.
edm. ÷ prot. ÷....	÷ C ÷ P	41.24	24.80	22.68	11.64
edm. ÷ prot. +....	+ P	24.74	8.30	13.68	2.64
edm. + prot. ÷....	+ C	25.76	9.32	12.92	1.88
edm. + prot. +....	+ + C	19.84	3.40	11.48	0.44

On chauffe alors pendant 20 minutes au bain-marie en ébullition la moitié de la solution de protéine contenant du formol pour en chasser, si possible, du formol; puis on l'expose, pendant 1 heure 45 minutes, à la température de 52°, à l'action d'une partie de l'extrait de malt exempt de formol (edm. ÷ prot. + chauffé). A titre de comparaison, on fait agir l'extrait de malt, simultanément, sur une

solution de protéine sans formol (edm. \div prot. \div) et sur une autre avec du formol mais dont on n'a pas expulsé de formol par la chaleur (edm. \div prot. + non chauffé).

	Az du liq. filtré du chlorure stann.	Az dédoublé	Az du liq. filtré de l'acide tannique	Az dédoublé
	mg.	mg.	mg.	mg.
edm. \div prot. \div	48.44	32.00	23.12	12.08
edm. \div prot. + non chauffé	23.64	7.20	"	"
edm. \div prot. +, chauffé. . .	27.68	11.24	14.44	3.40

Je n'entretrai pas dans la discussion des phénomènes de coagulation caractéristiques, que je ne note qu'en vue d'autres questions où ils seront d'un certain intérêt. Mais il résulte clairement de ces essais que l'aldéhyde de formol a la même influence très retardatrice, qu'on l'ajoute à la solution de protéine un mois d'avance ou à l'extrait de malt un jour d'avance. Si on l'ajoute à l'un et à l'autre, dans la quantité (2 p. c. de formol) de ces essais, il arrête presque toute action protéolytique. Son influence paraît être particulièrement grande sur l'activité révélée par la précipitation par le tannin: la tryptase. Cependant, il n'a, comme dans les essais de Leo Schwarz, aboli ni l'activité pepsique ni la trypsique: il n'a exercé qu'une influence fortement retardatrice sur toutes les deux. La supposition la plus probable c'est que son action a une influence affaiblissante, proportionnelle à sa concentration, sur les enzymes mêmes, et non pas qu'il soit entré en combinaison avec la protéine pour former un composé inattaquable par les enzymes. Ce qui frappe c'est l'influence extrêmement favorable qu'exerce le chauffage, pendant 20 minutes, de la solution de protéine à laquelle on a ajouté du formol. Là aussi je suis plutôt disposé à expliquer cet effet par la diminution du formol par suite de l'évaporation d'aldéhyde formique libre, quoique ce que dit Benedicenti (v. p. 222) de la décomposition de protéine et d'aldéhyde formique en chauffant par un courant de vapeur, fournisse peut-être aussi l'explication du phénomène.

Enfin j'ai examiné l'influence prolongée de l'action du formol sur le pouvoir fermentatif protéolytique d'un extrait de malt. Ainsi, j'ai laissé un extrait de malt avec 1 p. c. de formol dans l'armoire glacière, à la température de 5°, du 15 mai au 15 novembre. Le pouvoir fermentatif a subi les changements que voici: au bout de 2 heures d'action sur une solution de protéine, à 50°, les quantités d'azote suivantes se sont soustraites aux précipitations:

Azote du liquide filtré à la précipitation			
	par le chlorure stanneux		par l'acide tannique
le 15 mai.....	23.94 milligrammes		12.20 milligrammes
- 15 novembre .	4.76 —		0.68 —

On en voit qu'au bout de six mois le pouvoir fermentatif tryptique a presque cessé, tandis que le pouvoir fermentatif pepsique, tout en étant très affaibli, existe encore d'une manière sensible.

Il y a là, on le voit, bien des questions pleines d'intérêt et qu'il vaudrait la peine de reprendre pour les soumettre à un examen approfondi.

Toluol. Parmi les antiseptiques dont je me suis servi, le seul qui ait eu une influence peu retardatrice sur les enzymes protéolytiques des extraits de malt, c'est le toluol. D'autre part, sa valeur antiseptique n'est pas toujours, d'après mes expériences, particulièrement grande, surtout aux températures favorables au développement des bactéries. Mais, ainsi qu'il résultera des essais suivants, c'est un agent excellent pour la conservation, aux températures basses, de la propriété protéolytique et, surtout, de la propriété pepsique d'un extrait de malt. Le toluol étant insoluble ou peu soluble dans l'eau, la quantité de toluol ajoutée n'est guère d'importance. Ce qui est important, c'est qu'on „sature“ de toluol tout le liquide à essayer en bien secouant la masse. Une telle saturation s'opère le plus facilement en la présence d'une abondance de toluol. Aussi en conservant des extraits de malt est-il préférable d'ajouter assez de cette substance pour qu'une couche de toluol couvre le liquide.

L'extrait de malt servant aux essais suivants (Essais nos. 2019—34, 2231—34, 2257--60) contient, en 10^{cc}, 21 mg. 23 d'azote total. On s'en est servi partie à l'état frais et sans addition de toluol, partie après l'avoir laissé, pendant 8 jours, dans l'armoire glacière, à 5°, enfin après l'y avoir laissé 6 mois durant. Abandonné à lui-même dans l'armoire glacière, il reste couvert d'une couche de toluol. On secoue bien la masse trois ou quatre fois par jour pendant les premiers huit jours, puis trois ou quatre fois seulement pendant les six mois suivants. Tandis qu'à l'ordinaire les extraits de malt, placés dans l'armoire glacière sans addition de toluol, se font fortement acides en se troublant au bout de 3—4 jours, celui-ci s'est conservé parfaitement frais et tout limpide au bout de 8 jours; même au bout de 6 mois il a l'air tout frais, seulement de teinte un peu plus foncée et avec formation d'un précipité insignifiant. On en essaie le pouvoir fermentatif par le procédé ordinaire en employant 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine à 2 p. c., pendant 2 heures, à la température de 50°, le chlo-

rure stanneux et l'acide tannique servant de précipitants. Les résultats sont réunis dans le tableau suivant:

							Précipitation par le chlorure stanneux		Précipitation par l'acide tannique	
							Az du liq. filtré	Az dé-doublé	Az du liq. filtré	Az dé-doublé
7 mai 1901, extrait de malt frais, expérience passive ...							mg.	mg.	mg.	mg.
— — — — —							16.32	"	9.92	"
— — — — — avec 0 gouttes de toluol							40.26	23.94	22.12	12.20
— — — — — 2 — — —							"	"	21.16	11.24
— — — — — 4 — — —							"	"	20.96	11.04
— — — — — 6 — — —							38.24	21.92	20.60	10.68
— — — — — 8 — — —							"	"	20.04	10.12
— — — — — 10 — — —							"	"	20.60	10.68
15 — après 8 jours avec du toluol à 5°, expér. active ¹⁾							38.98	22.66	19.49	9.57
7 nov. — 6 mois avec du toluol, expér. passive....							16.28	"	13.12	"
— — 6 — — — — active							31.28	15.00	16.88	3.76

Il en résulte que de petites quantités de toluol exercent une action sensible, quoique minime, sur l'enzyme pepsique aussi bien que sur l'enzyme trypsique, et que cette influence ne s'accroît guère quand même la quantité de toluol augmente. Il s'ensuit encore du tableau que le pouvoir pepsique de l'extrait de malt n'est pas affaibli du tout au bout de 8 jours; et qu'au bout de 6 mois il conserve environ les $\frac{2}{3}$ de sa force primitive: pendant ce long espace de temps il est, pour ainsi dire, resté en suspens, la teneur de l'extrait de malt en composés azotés, échappés à la précipitation par le chlorure stanneux, étant restée au même point. Quant au pouvoir trypsique, un affaiblissement commence à se faire sentir, autant qu'on peut en juger, déjà au bout de 8 jours, mais tellement peu considérable que le pouvoir trypsique est encore apparent ($\frac{1}{3}$ de la force primitive à peu près) au bout de 6 mois de repos de l'extrait de malt. Ce pouvoir n'a pas été entièrement suspendu: la teneur de l'extrait de malt en composés azotés qui échappent à la précipitation par l'acide tannique a sensiblement augmenté.

¹⁾ Le temps d'essai a été, pour cette expérience, 2 heures et demie au lieu de deux heures. Aussi les chiffres trouvés ont-ils été réduits en multipliant par $\frac{4}{5}$ en supposant l'action proportionnelle à la durée. Il en résulte une erreur qui rend moins exacts les chiffres de cette série.

IV.

Nature et mode d'action des enzymes.

A tous les essais décrits plus haut on a opéré avec un extrait aqueux de malt vert au stade où, dans la fabrication du malt de la brasserie de Gamle Carlsberg, on interrompt la germination (c. à d. au neuvième jour de germination). Le pouvoir fermentatif protéolytique de cet extrait a été mesuré par l'action qu'il exerce sur une solution de protéine de froment ou, par exception, sur une solution de légumine. On a examiné la dépendance de la protéolyse — surtout aux phases révélées par les précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique — de facteurs divers: température, temps, quantité de ferment, concentration de la protéine, présence de matières étrangères, corrélations, enfin, entre tous ces facteurs. Comme la protéine de froment employée est congénère des matières protéiques déposées au grain d'orge comme réserve nutritive, il est permis de supposer que, pendant la germination, la protéolyse à l'intérieur du grain d'orge suit des lois semblables à celles que j'ai trouvées.

Les résultats obtenus ne laissent aucun doute que la protéolyse ne soit une action diastasique qui, par conséquent, peut se passer aussi en dehors de la cellule vivante. Un assez grand nombre de questions se présentent maintenant, auxquelles je vais tâcher de donner des réponses épuisant plus ou moins le sujet.

1° L'action est-elle causée par une seule enzyme ou par plusieurs se laissant séparer ou préparer à l'état pur?

2° Quelles en sont les propriétés physiques et chimiques?

3° Quelles sont les matières protéiques qu'elles pourraient dédoubler?

4° Quels sont les corps qui se forment pendant leur action?

5° A quel moment de la germination paraissent-elles;

6° ou se trouvent-elles déjà, à l'état actif ou sous la forme de proenzymes, au grain d'orge non germé?

Naturellement, on pourrait augmenter le nombre des questions, mais, quand je me borne à celles-là, c'est que je pense ne pouvoir donner, en ce moment, des contributions qu'à la solution de ces points-là.

En général, je n'ai pas suivi de plan systématique. Il faut considérer une partie de mes expériences là-dessus comme des digressions occasionnelles de mon but principal: trouver les lois générales de la protéolyse. Parmi ces questions, cependant, il y en a d'un attrait tellement grand que j'en ai fait l'objet de recherches spéciales.

L'ordre chronologique des expériences diffère de l'ordre que je suis en communiquant ici mes résultats. En effet, je crois pratique de faire ressortir d'abord ce qui sert à élucider les questions suivantes et, pour l'orientation du lecteur, je citerai quelquefois mes conclusions avant de donner les résultats expérimentaux sur lesquels je fonde ces conclusions.

Je commence tout de suite par l'exposition d'une des questions le plus pressantes et à laquelle j'ai touché plus d'une fois dans ce qui précède :

1. Y a-t-il dans l'orge en germination plusieurs enzymes protéolytiques se laissant séparer ou préparer à l'état pur?

J'ai déjà répondu à cette question en déclarant qu'à mon avis, il y en a deux, au moins: une enzyme pepsique et une enzyme trypsique, sans parler d'une enzyme coagulant les matières albuminoïdes et qui, comme la présure, agit sur la caséine du lait. Sur celle-ci, j'ai publié ailleurs quelques essais¹⁾. De même, j'ai dit plus haut qu'en parlant d'une enzyme pepsique et d'une enzyme trypsique j'entends par là des enzymes dont la première ne mène le dédoublement de matières protéiques qu'aux albumoses et aux peptones ou à des substances précipitables par l'acide tannique, mais imprécipitables par le chlorure stanneux, tandis que la dernière continue le dédoublement de ces produits de dédoublement, de manière à former des composés qui se soustraient non seulement à la précipitation par l'acide tannique, mais encore, en partie, à la précipitation par l'acide phosphotungstique et par l'acétate uranique, et parmi lesquels on trouve, entre autres substances, des quantités considérables d'ammoniaque, ainsi que, dans quelques cas (à la digestion de fibrine) des groupes donnant, dans une solution acéteuse, avec de l'eau de brome, la réaction de tryptophane. Je reviendrai plus tard sur la caractérisation particulière de ces enzymes. J'exposerai tout de suite les raisons de mon assertion. Puis j'examinerai si les deux enzymes sont à même d'agir indépendamment l'une de l'autre, ou s'il y a, entre elles, une dépendance mutuelle.

Il résulte de ce qui a été dit dans la partie précédente (III) que la protéolyse présente deux phases, au moins, ou qu'elle consiste en deux activités qui font voir des rapports de dépendance un peu différents vis à vis des facteurs extérieurs. Ainsi on trouve une différence frappante en examinant l'influence de la température sur les deux activités qui se révèlent par les précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique (v. p. 167 ss.). Ce n'est pas seulement que les

¹⁾ Fr. Weis: Zeitschr. für physiol. Chemie XXXI, 96 (1900).

deux courbes de température varient beaucoup de forme, mais les minima et les optima se trouvent à des températures diverses, ainsi que j'ai fait observer p. 174 (v. aussi Pl. I).

Si l'on suit la protéolyse pendant un temps très long, on voit une différence frappante entre le cours des deux actions. A des concentrations faibles de protéine (1 p. c.), l'une (la pepsique) a atteint son maximum au bout d'environ 3—6 heures, tandis que l'autre (la trypsique) se passe plus lentement pour commencer, mais, d'autre part, se continue d'une manière uniforme jusque vers les 48 heures, période où les courbes, indiquant les deux actions, se coupent presque. Quand même on emploie des concentrations plus fortes de protéine ($2\frac{1}{2}$ et 5 p. c.), la courbe pepsique se caractérise toujours par son accroissement très rapide, pendant la première heure presque perpendiculaire, mais qui s'incline relativement vite et d'une manière très prononcée vers l'axe des abscisses, tandis que la courbe trypsique monte moins rapidement pour commencer, mais continue pendant un temps assez long dans la même direction. — Il y a, naturellement, un rapport de dépendance mutuelle entre les deux actions, l'une des courbes étant, en partie, déterminée par l'autre, rapport sur lequel je vais revenir.

Il résulte encore de mes essais sur l'influence qu'exercent sur la protéolyse les matières étrangères, que les deux phases de celle-ci en sont influées à un degré assez différent, c'est à dire qu'elles ne se déroulent pas également bien dans le même milieu. C'est ce qu'on pourra, sans doute, observer particulièrement bien en ajoutant des quantités différentes d'acides, qui jouent un si grand rôle comme agents zymoplastiques. Malheureusement je n'ai, jusqu'à présent, examiné l'influence des acides que sur l'une des deux actions, la trypsique. Mais les indications que donnent mes essais sur l'influence des alcalis portent à croire, ce que prouvent à l'évidence les essais sur l'influence d'antiseptiques, que la même substance agit, à un degré très différent, sur les deux actions.

L'hydrate de sodium aussi bien que le carbonate de sodium neutre ont beaucoup moins de pouvoir zymoplastique, supposé qu'en général ils en aient (j'ai déjà dit, à la p. 204, qu'on n'a pas examiné ce qui se passe en milieu neutre), que les acides examinés; et l'addition d'un tout petit peu d'alcali empêche complètement la protéolyse. Ceci est le cas, particulièrement, pour l'action trypsique, paralysée aux moindres doses d'alcali à un tel point qu'elle cesse complètement à une concentration égale à une liqueur titrée normale alcaline au 40^e.

A la p. 219 et suivantes j'ai décrit, en détail, l'action qu'exercent des antiseptiques, surtout le formol et le toluol, sur la propriété pro-

téolytique de l'extrait de malt. Je me bornerai ici à relever quelques traits particulièrement frappants.

En regardant le rapport entre le dédoublement pepsique et le trypsique au bout d'un temps peu étendu — 2 heures — si on n'a ajouté ni antiseptique ni autre substance nuisible, on verra qu'il est, à l'ordinaire, comme $\frac{2}{1}$, c'est à dire qu'au courant de ce temps il s'est soustrait deux fois autant, à peu près, d'azote à la précipitation par le chlorure stanneux qu'à la précipitation par l'acide tannique. Mais si l'on a ajouté des antiseptiques, ou surtout si, avant de faire l'essai, on a soumis, pendant quelque temps, l'extrait de malt à l'action d'un antiseptique, ce rapport se rompt presque toujours, le dédoublement trypsique s'affaiblissant beaucoup plus que le dédoublement pepsique ou finissant par s'arrêter presque entièrement (v. Essais p. 223 et 226). Ainsi, tandis que, dans un extrait de malt laissé, pendant six mois, avec du toluol, le pouvoir pepsique n'avait abaissé qu'à $\frac{2}{3}$, à peu près, de sa force primitive, le pouvoir trypsique était descendu à $\frac{1}{3}$. Dans un autre échantillon du même extrait de malt, laissé, pendant le même temps, avec du formol, l'affaiblissement avait atteint environ $\frac{1}{5}$ et $\frac{1}{18}$ du pouvoir fermentatif primitif, ou le rapport entre le pouvoir pepsique et le pouvoir trypsique était, dans la préparation de toluol, d'environ 4 à 1, dans la préparation de formol, de 7 à 1.

Ces faits me semblent parler en faveur de l'existence de deux causes, au moins, des différentes phases de la protéolyse, et si l'on part de l'avis que l'action est diastasique — ce qui revient à dire qu'on n'en connaît pas la vraie cause — et si l'on considère que les enzymes sont des unités soit chimiques soit physiques, c'est à dire qu'elles sont, ou des individus chimiques d'une constitution particulière ou des vibrations moléculaires d'une qualité déterminée, il me semble logiquement nécessaire de rapporter les actions diverses à des enzymes diverses: à deux, au moins. Tant que, pour les enzymes, on n'a d'autre criterium que leurs effets, il faudra supposer l'existence d'une enzyme spéciale pour chaque action spécifique qui se passe d'après des lois bien déterminées. On pourrait se figurer, il est vrai, qu'une seule et même enzyme pourrait exercer des effets différents dédoubleant des molécules différentes (on connaît très bien de ces enzymes, par exemple, l'émulsine et la myrosine). Mais si le dédoublement d'une molécule suit des lois tout autres que fait le dédoublement d'autres molécules, ou si un extrait de malt, par suite d'influences extérieures diverses, perd complètement ou presque complètement le pouvoir de provoquer certains dédoublements, tout en conservant presque intact le reste de ses fonctions, c'est un phénomène dont on trouve l'explication la plus naturelle en supposant que ce facteur

extérieur détruit ou affaiblit quelque enzyme, sans agir de même sur d'autres enzymes.

Ce qui parle en faveur de cette manière de voir plus encore que tout ce que je viens de dire, ce sont les résultats d'une petite série spéciale d'essais. A plusieurs reprises, j'avais essayé de faire une préparation d'enzyme sèche en ajoutant à un extrait de malt aqueux 3—4 fois son volume d'alcool absolu. Le précipité, séparé par filtration, était lavé à sec à l'alcool, puis séché dans le vide sur de l'acide sulfurique. Après l'avoir redissous dans de l'eau, on en a essayé le pouvoir protéolytique, comme à l'ordinaire, en le faisant agir sur une solution de protéine faiblement acidulée par de l'acide lactique. Aux premiers essais je n'y employais, comme précipitant, que l'acide tannique. Les traits de pouvoir fermentatif (trypsique) obtenus ainsi étaient nuls ou tellement petits que j'étais plutôt disposé à les considérer comme causés par des erreurs expérimentales et à accepter l'impossibilité de produire ainsi une préparation d'enzyme active.

Plus tard, j'ai procédé d'une manière un peu différente. J'ai fait digérer 440^{gr} de malt vert écrasé avec 440^{cc} de glycérine + 150^{cc} d'eau. Après des agitations répétées, le mélange a été laissé dans l'armoire glacière pendant deux fois vingt-quatre heures. Puis, on l'a pressuré. Le liquide obtenu ainsi est jeté sur un filtre et laissé dans l'armoire glacière pendant vingt-quatre heures. On a obtenu ainsi 400^{cc} de liquide filtré clair. On en a versé 300^{cc} en filet mince dans 2 litres d'alcool absolu. Le précipité formé est séparé par filtration sur un appareil de Büchner. On le lave à l'alcool absolu (pour enlever l'eau et la glycérine); on le sèche sur le filtre, à l'air. Le lendemain, on le pulvérise: on le lave de nouveau à l'alcool absolu. On le laisse sécher à l'air jusqu'au lendemain. Enfin, on le sèche dans le vide, sur de l'acide sulfurique, pendant 10 jours. Le produit total obtenu, pesant 4^{gr}, consistait en une poudre blanche d'une teinte jaunâtre. On fait digérer 0^{gr}.5 de cette poudre avec 100^{cc} d'eau et 0^{gr}.1 d'acide lactique; on chauffe à 50°, et on laisse le mélange dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. On sépare par filtration la partie en solution (Enz.-Aq.). On traite le résidu avec de la glycérine, qui le dissout presque complètement. On filtre cette solution (Enz.-Glyc.) avant de s'en servir. On mesure le pouvoir fermentatif protéolytique des deux solutions en faisant agir, pendant 2 heures, à 50°, sur des volumes égaux d'une solution de protéine à 2 p. c. dans de l'acide lactique à 0.4 p. c., ce qui donne aux liquides à essayer une teneur en acide lactique de 2.5 p. m. et 2 p. m. respectivement. Comme précipitants, on se sert d'acide tannique et de chlorure stanneux. Les résultats se voient des tableaux suivants:

	Précipitation par	Az du liquide filtré		Az dé- doublé
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 50°	
		mg	mg	mg
Enz.-Aq.....	le chlorure stann.	2.44	5.64	3.20
— —	l'acide tannique	1.28	1.28	0.00
Enz.-Glyc.	le chlorure stann.	2.10	2.10	0.00
— —	l'acide tannique	0.70	0.40	÷ 0.30

Comme auparavant, l'action de la phase révélée par le tannin est nulle (le chiffre négatif d'„Az dédoublé“ du dernier essai doit être attribué à des erreurs expérimentales), tandis que l'action pepsique est assez considérable, vu la concentration de la solution diastasique (je reviendrai tout à l'heure sur ce dernier point).

Après, j'ai fait encore une série d'essais avec la même préparation en employant, pourtant, une concentration double de l'enzyme (1 p. c.), obtenue en traitant la préparation sèche d'enzyme, pendant une demi-heure, à 45°, avec de l'eau faiblement acidulée par de l'acide lactique. La solution a été mise en usage tout de suite après la filtration. De peur que la préparation ne fût trop pauvre en cendres, on y a ajouté 1/2 p. c. de chlorure de sodium. Pour le contrôle, on a chauffé une partie de la solution à 100° pour détruire l'enzyme. Puis on mélange, comme auparavant, la partie non-bouillie et la partie bouillie avec la solution de protéine, laissant reposer les mélanges, à 50°, pendant 2 heures. En voici les résultats:

	Précipitation par	Az du liquide filtré		Az dé- doublé
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 50°	
		mg	mg	mg
Solut. d'enzyme non bouillie	le chlorure stann.	4.32	12.10	7.78
— — — —	l'acide tannique	1.78	2.92	1.14
Solution d'enzyme bouillie	le chlorure stann.	4.08	4.24	0.16
— — —	l'acide tannique	1.72	1.84	0.12

Tandis que les traits de la solution d'enzyme bouillie sont du ressort des erreurs expérimentales, la solution non bouillie fait preuve d'une action trypsique prononcée. Mais, proportionnellement à la concentration des enzymes, l'action pepsique a doublé, comparée à celle

du premier essai. Elle n'est pas beaucoup plus faible que l'action correspondante d'un extrait de malt frais¹⁾.

Ainsi quand même l'activité trypsique n'a pas été entièrement supprimée, le rapport entre les pouvoirs fermentatifs pepsique et trypsique est de $7.78/1.14 =$ environ $7/1$ comparé au rapport ordinaire de $2/1$, en d'autres mots: l'affaiblissement du pouvoir fermentatif trypsique est encore plus grand qu'à l'addition d'antiseptiques à un extrait de malt.

Il est donc naturel de conclure que des deux enzymes protéolytiques dont je crois avoir démontré l'existence dans un extrait de malt, une seule s'obtient sans affaiblissement notable à la précipitation ordinaire par l'alcool absolu. Probablement l'alcool en détruit l'autre, ce qui s'accorde avec le fait (v. pp. 218—19) que la phase trypsique de la protéolyse est considérablement retardée par l'addition d'alcool, et cela proportionnellement à la force croissante des concentrations de cette substance. Il serait très intéressant de rechercher quelle est l'action qu'exerce l'alcool sur la phase pepsique de la protéolyse. Peut-être l'addition d'alcool empêcherait-elle le dédoublement au-delà de la formation d'albumoses et de peptones. — Peut-être aussi sommes-nous en bonne voie pour arriver à la séparation complète des deux enzymes et à la préparation à l'état pur de l'une d'elles.

La preuve absolument sûre de l'existence de deux enzymes demanderait la séparation complète de leurs actions. A cet égard, mes essais ne sont pas tout-à-fait satisfaisants. C'est aussi une question si l'une des enzymes pourra agir tout indépendamment de l'autre, ou s'il existe entre elles un rapport de dépendance soit unilatérale soit mutuelle. Mes essais semblent indiquer que l'enzyme pepsique peut agir sans le concours de la trypsique, mais jusqu'à quel point celle-ci exerce sur l'autre une influence favorable ou une influence retardatrice, c'est ce qui ne résulte pas clairement de mes essais. Cependant, je suis disposé à croire qu'il faut que l'enzyme trypsique — toute abstraction

¹⁾ Ceci résultera de la considération que voici: en comptant que 10^{cc} de l'extrait de malt primitif dédoublent, en 2 heures, à 50°, 10^{mg} d'azote de manière à les rendre imprécipitables par le chlorure stanneux, 300^{cc} dédoubleront 300^{mg} d'azote. Si la préparation d'enzyme n'était pas affaiblie, 4^{gr} de celle-ci en feraient de même, supposé que toute l'enzyme fût précipitée. Par conséquent, 10^{cc} d'une solution à 0.5 p. c. dédoubleraient 3^{mg}.75 d'azote et 10^{cc} d'une solution à 1 p. c. 7^{mg}.50 d'azote en 2 heures. Or, l'azote dédouble, trouvé aux concentrations correspondantes, est de 3^{mg}.20 et de 7^{mg}.78. Ainsi, quand même l'action protéolytique d'un extrait de malt frais est calculée assez bas ici, le pouvoir fermentatif pepsique de la préparation sèche s'approche du pouvoir fermentatif ordinaire, surtout en considérant qu'une partie de la préparation s'est perdue pendant la manipulation (v. p. 237 le pouvoir fermentatif d'extraits de glycérine comparés aux extraits aqueux).

faite de sa propriété possible de peptoniser, c'est à dire de former les premiers produits de dédoublement hydrolytiques (albumoses, peptones) — soutienne la pepsique en en éloignant les produits de fermentation, qui, sans cela, arrêteraient probablement la peptonisation, arrivée à un point d'équilibre. D'autre part, l'enzyme pepsique accélérera, sans doute, le dédoublement trypsique en se chargeant des premières phases de la protéolyse et en produisant ainsi des matériaux de fermentation moins compliqués. La marche plus lente de l'activité trypsique s'explique par le fait que c'est l'enzyme pepsique qui doit continuellement lui fournir de nouveaux matériaux de fermentation, et encore par cette autre circonstance que rien n'éloigne les produits de fermentation de l'activité trypsique, à moins d'admettre l'existence d'une série d'autres enzymes qui continuent, de phase en phase, le dédoublement de la molécule d'albumine jusqu'à ce qu'il atteigne les composés minéraux les plus simples, supposition qu'aucune considération aprioristique n'empêche d'accepter.

Ce serait une discussion sans issue que celle qui, en se fondant sur les essais décrits plus haut, entamerait la question de décider si l'enzyme trypsique est à même de peptoniser ou non. A l'ordinaire, on voit dans la trypsine animale une seule enzyme, manière de voir qui, à mon avis, est très douteuse, et on lui attribue la propriété de former aussi des albumoses et des peptones. S'il en était ainsi, il n'y aurait pas lieu de refuser à la trypsine végétale la même propriété. Mais on verra facilement que la décision de cette question est extrêmement difficile, vu qu'on pourra expliquer tout trait positif de peptonisation en maintenant qu'on n'aura pas complètement écarté l'enzyme pepsique, et, d'après tout ce que nous savons, les enzymes trypsiques semblent bien plus sensibles aux influences extérieures nuisibles que les enzymes pepsiques¹⁾.

Mais, dans tous les cas, il faudra prendre en considération ce concours des deux enzymes si on désire trouver les fonctions de chacune d'elles. Les courbes, trouvées plus haut, pour la phase pepsique de la protéolyse, auraient peut-être pris des formes tout autres si l'activité trypsique ne s'était pas simultanément opérée. Aussi j'écarte toute interprétation d'après laquelle je croirais avoir trouvé, pour les deux enzymes, des lois qu'elles suivraient aussi si elles agissaient séparément. Tout en tâchant de faire des analyses, je me rends

¹⁾ Du reste, on connaît aujourd'hui une enzyme qui n'est pas capable de dédoubler les matières albuminoïdes proprement dites, mais bien les albumoses et les peptones pour en faire des composés cristallins: l'érepsine, décrite par Cohnheim (v. Zeitsch. f. physiol. Chemie XXXIII, 459 (1901) et XXXV, 134 (1902).

très exactement compte du peu que j'ai obtenu pour opérer la séparation des deux activités. S'il y a un point sur lequel je désire insister c'est celui-ci: à mon avis, la protéolyse à l'intérieur de l'orge en germination est beaucoup trop compliquée pour qu'on puisse dégager toutes les phases de sa marche d'après les données que j'ai fournies. Ce que j'ai fait c'est, plutôt, d'avoir soulevé une série de problèmes nouveaux.

Je pense, pourtant, qu'on trouvera dans ce que j'ai exposé assez de raisons pour accepter la supposition que, dans l'orge en germination, il y a, au moins, deux enzymes protéolytiques: la peptase et la tryptase.

2. Propriétés chimiques et physiques.

Ce que j'ai à communiquer à ce sujet se rapporte notamment à l'enzyme trypsique, la plupart des essais étant faits en ne se servant, comme précipitant, que de l'acide tannique. Mais comme, le plus souvent, j'ai opéré avec des extraits de malt contenant toujours en même temps l'enzyme pepsique, les résultats de mes essais ne peuvent pas prétendre à une validité absolue pour l'une des enzymes, qui se comporterait peut-être tout autrement si elle était isolée. J'ai déjà donné plus haut un assez grand nombre de détails dont la place naturelle serait ici. Je me bornerai ici à y renvoyer le lecteur (avant tout à la partie sur la „Dépendance de la présence de matières étrangères“, III, 8).

Solubilité. Il est caractéristique pour, je pense, toutes les enzymes connues qu'elles soient solubles dans l'eau. A cet égard, celles que je traite ici ne font pas exception. En effet, j'ai pour ainsi dire toujours opéré avec un extrait aqueux de malt. La question qui se posait, était, cependant, s'il n'y avait pas de dissolvants préférables: n'obtient-on pas une action fermentative plus énergique en préparant les extraits de malt d'une autre manière? Il était tout indiqué d'essayer de faire l'extraction au moyen d'une solution faible d'un des acides qui, d'après les expériences faites, favorisaient la protéolyse. J'ai choisi, à cet effet, l'acide lactique me servant aussi bien de malt vert que de malt touraillé. J'ai essayé aussi l'effet qu'exerce sur le pouvoir fermentatif d'un extrait de malt vert l'addition d'une petite quantité de glycérine (2 p. c.).

(Essais nos. 1155—1170). Le malt employé est du malt touraillé moulu en farine fine et qu'on fait digérer, pendant 2 heures, dans l'armoire glacière, en agitant toutes les 10 minutes, à peu près:

1° 100^{gr} de malt + 400^{gr} d'eau (= edm.-aq.)

2° 100^{gr} de malt + 400^{gr} d'eau acidulée d'acide lactique à 0.2 p. c. (= edm.-lact.).

On ajoute à 10^{cc} des liquides filtrés 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. contenant 0.4 p. c. et 0.2 p. c. d'acide lactique, de sorte que la concentration de celui-ci, dans le liquide à essayer, est toujours de 0.2 p. c. On précipite pour commencer et au bout de deux heures, à 47°, par l'acide tannique.

	Az total	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
	mg	mg	mg	mg
edm.-aq.	10.72	5.90	5.94	0.04
edm.-lact.	11.46	6.82	7.72	0.90
edm.-aq. + protéine	—	—	9.00	3.10
edm.-lact. + protéine	—	—	11.62	4.80

On voit que l'extrait à l'acide lactique était un peu plus riche en azote et qu'il avait un pouvoir fermentatif plus grand que l'extrait aqueux.

(Essais nos. 1775—1798). Malt vert, écrasé, comme à l'ordinaire, et digéré:

1° 3 parties de malt avec 4 parties d'eau (= edm.-aq.)

2° — — — — — et 0.2 p. c. d'acide lactique
(= edm.-lact.)

3° — — — — — et 2 p. c. de glycérine
(= edm.-glyc.)

On laisse reposer pendant 30 minutes à la température ambiante en agitant. On jette sur des filtres qu'on laisse dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. On essaie, comme plus haut, l'action qu'exercent les extraits de malt sur de la protéine de froment à une concentration d'acide lactique à 0.2 p. c. On précipite pour commencer et au bout de 2¹/₂ heures, à 47°, par l'acide tannique.

	Az total	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 ¹ / ₂ heures à 47°	
	mg	mg	mg	mg
edm.-aq.	19.33	9.18	21.14	11.96
edm.-lact.	22.38	11.64	23.32	11.68
edm.-glyc.	18.90	9.28	19.80	10.52

Pratiquement parlant, l'extrait aqueux et l'extrait à l'acide lactique se comportent de la même manière quant au pouvoir fermentatif; le dernier, toutefois, contient plus d'azote total et plus d'azote imprécipitable par le tannin — à cause, sans doute, d'une protéolyse qui s'y est faite pendant l'extraction. L'extrait glycérinien, au contraire, le cède aux deux autres tant à l'égard du pouvoir fermentatif que de la teneur en azote. Mais la différence n'est que minime. — L'enzyme elle-même est donc aussi soluble dans l'eau que dans un liquide faiblement acide ou glycérinien. Le fait que son action est favorisée par l'addition d'acide lactique ne porte nullement sur sa solubilité. (Pour l'influence de la neutralisation passagère d'un extrait de malt à réaction acide v. p. 211).

Nous avons déjà fait remarquer que le précipité obtenu en versant l'extrait de malt vert aqueux et glycérinien dans de l'alcool absolu n'a qu'un pouvoir fermentatif trypsique faible, tandis qu'on pouvait montrer l'existence d'une action pepsique énergique dans la préparation faite de l'extrait glycérinien (v. p. 231 ss.). Un extrait aqueux aurait probablement donné une préparation pepsique tout aussi énergique, mais je n'ai pas fait d'essai direct à ce sujet. Si le pouvoir fermentatif trypsique ne se trouve que peu développé dans ces préparations, on pourrait se figurer que l'enzyme en question restait en solution. Ceci, cependant, n'est que peu probable, parce que le pouvoir fermentatif trypsique est lié à des composés non dialysables (dont nous parlerons plus loin) qui, en ce cas, seraient probablement précipités par l'alcool.

Le produit précipité de l'extrait glycérinien par l'alcool et contenant, à ce qu'il faut croire, l'enzyme et d'autres substances, surtout des substances albuminoïdes et des phosphates, a donné, dissous à l'eau, la réaction du biuret très belle et très forte; mais le chlorure stanneux ne le précipitait pas complètement.

Diffusibilité. La question de savoir si les substances douées de pouvoir fermentatif sont diffusibles ou non est d'un grand intérêt aussi bien pour décider le groupe de substances auquel elles appartiennent que pour comprendre une série d'actions physiologico-chimiques à l'intérieur de l'organisme vivant. La plupart des recherches faites ont abouti à la conclusion que les enzymes ne sont point diffusibles, ou ne le sont que très peu. Comme plusieurs autres raisons indiquent qu'elles ont leur place parmi les composés de protéine, elles sont probablement soit des substances albumines proprement dites, soit, en tout cas, des dérivés de ces substances et des dérivés aussi compliqués, pour le moins, que les albumoses et les composés congénères de celles-ci.

Les essais que j'ai faits avec les enzymes traitées ici viennent confirmer, dans les points essentiels, cette supposition générale. Comme la question présente un très grand intérêt et que mes premiers résultats semblaient indiquer une diffusibilité faible chez les enzymes, j'ai fait deux séries d'essais en me servant d'extraits de malt différents.

I^{re} Série (Essais nos. 1995—2018). Le 5 mai, à 4 heures, j'ai préparé un extrait de malt vert. Le même jour, j'en ai mis 150^{cc} dans une vessie de poisson étanche, que j'ai suspendue dans un vase cylindrique contenant 150^{cc} d'eau distillée. Le tout a été placé dans l'armoire glacière jusqu'à 10 h. du lendemain matin. Il y avait alors 160^{cc} à l'intérieur de la vessie (A) et 140^{cc} au dehors (B). J'ai tiré des échantillons des deux liquides (A et B) pour y doser l'azote total, l'azote échappant à la précipitation par le chlorure stanneux et par l'acide tannique, et pour mesurer le pouvoir fermentatif protéolytique des deux solutions, tant dans le sens pepsique que dans le sens tryptique, les faisant agir, à cette intention, pendant 3 heures, à la température de 50°, sur une solution de protéine.

	Az total	Az du liquide filtré de 10 ^{cc} de protéine + 10 ^{cc} d'edm. précipités par le chlorure stanneux			Az du liquide filtré de 10 ^{cc} de protéine + 10 ^{cc} d'edm. précipités par l'a- cide tannique		
		pour commen- cer	au bout de 3 heures	Az dé- doublé	pour commen- cer	au bout de 3 heures	Az dé- doublé
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
6 mai, A.	12.22	9.40	27.56	18.16	4.84	11.72	6.88
B.	2.22	4.12	4.64	0.52	2.08	2.28	0.20
7 mai, après 24 heures de dia- lyse ultérieure							
A.	10.82	8.84	25.16	16.32	4.08	10.20	6.12
B.	3.64	5.48	5.80	0.32	3.44	3.52	0.08

Il paraît donc que le 6 mai le premier dialysatum, B, avait un tout petit peu de pouvoir fermentatif tant pepsique que tryptique, qui, cependant, le lendemain avait considérablement diminué, malgré l'augmentation considérable de l'azote total du dialysatum. Mais comme il est impossible de fonder des conclusions sûres sur des chiffres aussi petits, j'ai fait les essais nouveaux que voici :

II^e Série (Essais nos. 2151—2170). J'ai préparé l'extrait de malt le 20 mai. Laissé dans un sceau à glace, il est resté parfaitement clair, conservant un pouvoir fermentatif très grand, ainsi que le feront

voir les essais. Le 31 mai, j'en ai placé 200^{cc} dans une vessie, que j'ai plongée dans un vase cylindrique étroit, contenant 100^{cc} d'eau distillée, qui montait à une hauteur telle que le liquide à l'intérieur de la vessie était d'environ 0^{cm}.5 au dessus de celui qui se trouvait au dehors. Pour m'assurer que la vessie était bien étanche, je l'ai suspendue librement à l'air une demi-heure avant de m'en servir, remplie d'eau: pas une goutte n'en est sortie. Le lendemain, 1^{er} juin, le liquide à l'intérieur de la vessie était de 2^{cc}.5 plus haut placé qu'au dehors; le volume était augmenté de 18^{cm}. Pour constater ultérieurement que la vessie était parfaitement étanche, on y a mis, après l'avoir vidée, 175^{cc} de l'extrait de malt primitif, et on l'a plongée dans le vase cylindrique contenant 100^{cc} d'eau. Les surfaces étaient de hauteurs absolument égales à l'intérieur de la vessie et au dehors d'elle. Mais deux jours après (3 juin), la surface à l'intérieur était de 3^{cm} au-dessus de la surface extérieure; le volume de l'eau avait descendu à 75^{cc}. Ceci se passait dans l'armoire glacière.

Aux essais suivants on indique, comme tout à l'heure, le liquide à l'intérieur de la vessie par A, le dialysatum au dehors par B. L'extrait de malt primitif est marqué „edm. prim.“ :

	Az total	Az du liquide filtré de 10 ^{cc} de protéine + 10 ^{cc} d'edm. précipités par le chlorure stanneux		
		pour commencer	au bout de 2½ heures à 50°	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg
edm. prim.....	19.37	15.74	42.68	26.94
A	15.87	12.30	38.18	25.88
B	7.48	8.74	8.72	÷ 0.02

Par un calcul on trouvera que la somme de l'azote total de A et de B est un peu plus grand qu'à l'extrait de malt primitif:

Az total en 10^{cc} d'A = 15^{mg}.87; soit en 218^{cc} = 345^{mg}.97

— — de B = 7^{mg}.48; — 82^{cc} = 61^{mg}.34

total... 407^{mg}.31; mais

Az total en 10^{cc} d'edm. prim. = 19^{mg}.37 donne en 200^{cc} d'edm. 387^{mg}.40

différence... 19^{mg}.91

d'où s'ensuit que 20^{mg} d'azote environ proviennent de la vessie qui, sans doute, aura aussi été attaquée par les enzymes protéolytiques.

Du reste, il résulte de ces essais que, malgré le pouvoir fermentatif extraordinaire de l'extrait de malt employé et quoique la quantité d'azote diffusée soit plus grande que celle de la série d'essais précédente, aucun pouvoir fermentatif pepsique notable ne se laisse constater au dialysatum, ou qu'aucune enzyme pepsique n'a passé dehors par diffusion.

Si l'on ne considère pas que les résultats de la première série se trouvent au-dedans des limites des erreurs expérimentales, il faut conclure des deux séries que les enzymes protéolytiques d'un extrait de malt ne sont qu'à un degré minime diffusibles à travers une membrane animale comme celle dont on s'est servi ici.

Résistance à des facteurs extérieurs. 1^o Dessèchement. — En examinant l'influence du dessèchement sur les ferments protéolytiques il faut, naturellement, prendre en considération la température à laquelle il se passe. On a donc affaire ici à un facteur double. On sait qu'en préparant le malt, dans la pratique, on finit par lui faire subir un dessèchement soit à l'air, à la température ordinaire (du malt séché à l'air), soit à la touraille, à des températures croissantes qui, comme c'est le cas à la malterie de la brasserie de Gamle Carlsberg, finissent par atteindre 90°—95° (du malt touraillé). On sait encore que, si la température augmente doucement au fur et à mesure que le dessèchement se fait, les préparations d'enzymes supportent une température beaucoup plus élevée (au-dessus de 100°, voir même jusqu'à 150°) que si on les expose subitement, à l'état humide, à une grande chaleur. Il faut donc s'attendre à trouver, dans le malt touraillé, le pouvoir fermentatif conservé. Dans ce qui précède nous avons, à l'occasion, décrit des essais qui montrent qu'il en est ainsi (v. p. 235). Mais je ne puis pas répondre, d'une manière décisive, à cette question: le pouvoir fermentatif protéolytique s'est-il affaibli ou s'est-il peut-être accru (ceci n'est que très peu probable) pendant la torréfaction? En effet, je n'ai pas suivi le pouvoir fermentatif protéolytique du même échantillon de malt pendant les différents stades de la torréfaction, dès le malt vert. En général, je n'ai pas attaché d'importance à la comparaison du pouvoir fermentatif de mes divers extraits ou, ce qu'il faudrait ici, du pouvoir fermentatif du malt vert et du malt touraillé. A ce propos je ferai observer qu'à de telles comparaisons on pourra partir d'unités diverses de la force de l'extrait de malt, par exemple, soit de sa richesse en matières sèches, soit de sa richesse en azote, unités qui ne correspondraient peut-être pas toujours les unes aux

autres et qui donneraient, assurément, des résultats variés à l'égard du pouvoir fermentatif. Là où j'ai cherché à comparer le pouvoir fermentatif d'extraits divers — par exemple en examinant l'apparition des enzymes pendant la germination — (v. plus loin V, 1), j'ai pris pour unité la teneur en azote, étant d'avis qu'on obtient ainsi les meilleurs résultats dans ce cas. Aux essais auxquels je vais passer maintenant, les extraits de malt ont été préparés de malt et d'eau dans des proportions différentes. Aussi leur richesse en azote aussi bien que leur pouvoir fermentatif ont-ils beaucoup varié, ce qui peut tenir aux variations individuelles des échantillons de malt.

(Essais nos. 671—680, 1187—1206). Le malt touraillé, finement moulu, est délayé avec des quantités d'eau variées en agitant fréquemment, pendant $\frac{1}{2}$ —1 heure, à la température ordinaire. On le place, jeté sur un filtre, dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. Comme à l'ordinaire, on fait agir le liquide filtré sur une solution de protéine acidulée d'acide lactique.

	Az total de 10 ^{cc} d'edm.	Az du liquide filtré de 10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de protéine, précipités par l'acide tannique		
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 47°	Az dédoublé
	mg	mg	mg	mg
1 partie de malt + 2 parties d'eau . . .	22.06	10.74	22.64	11.90
1 — — 4 — — . . .	13.20	7.00	—	—
1 — — 4 — — . . .	10.29	5.74	9.90	4.16
1 — — 4 — — (bouil- lie)	10.28	5.64	5.62	÷ 0.02

On voit ici un pouvoir fermentatif trypsique très grand à l'extrait préparé de 1 partie de malt + 2 parties d'eau, mais qui, quant à la richesse en azote, ne dépasse que peu les extraits de malt vert ordinaires, tandis que, pour sa teneur en matières sèches, très riches en sucre, il doit les dépasser de beaucoup (le malt vert contient, on le sait, environ 50 p. c. d'eau). Aux échantillons préparés avec une quantité d'eau correspondant aux extraits de malt (1 sur 4), la richesse en azote et le pouvoir fermentatif sont beaucoup moins grands qu'à l'ordinaire et, cela va sans dire, le pouvoir fermentatif est complètement détruit à échantillon bouilli (v. aussi les essais p. 236).

A une autre série d'essais (nos. 881—894), j'ai examiné l'influence qu'a exercée sur le pouvoir fermentatif d'un extrait de malt vert

l'évaporation à sec de l'extrait. On prépare l'extrait, comme à l'ordinaire, de 3 parties de malt sur 4 parties d'eau. Le pouvoir fermentatif trypsique primitif se détermine par l'action sur de la protéine pendant six quarts d'heure, à la température de 45° , le jour même de sa préparation. Du reste, le pouvoir fermentatif n'est pas particulièrement grand. Après l'avoir laissé jusqu'au lendemain dans l'armoire glacière, on en a mis 400^{cc} (9 janvier 1900) dans un ballon de 4 litres. Pour empêcher le débordement de mousse, ce ballon communique avec un autre ballon, renversé, de même volume. On évapore à 20—30^{mm} de pression barométrique. La température à l'intérieur du ballon, oscillant entre 30° et 37° , est, en général, de 31° — 32° . Pour commencer, le liquide mousse beaucoup. Au bout de 3 fois 24 heures il ne reste qu'une masse sirupeuse, qu'on évapore dans le vide, à la température de 40° — 50° qu'on a grand soin de ne jamais dépasser, jusqu'à ce qu'elle forme une croûte fixe. Pour sortir la croûte, il a fallu séparer le fond du ballon en le coupant. On a desséché la croûte dans le vide sur de l'acide sulfurique, à la température ordinaire, du 12—16 janvier. En la pulvérisant, on en fait une poudre fine de couleur brune. Pour en examiner le pouvoir fermentatif trypsique, on le dissout dans des quantités d'eau diverses, obtenant des solutions très foncées. On en mêle 10^{cc} avec 10^{cc} de la solution ordinaire de protéine. On dose l'azote qui, pour commencer, se soustrait à la précipitation par l'acide tannique, et l'azote qui s'y soustrait au bout de six quarts d'heure.

	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		
	pour com- mencer	au bout de six quarts d'heure à 45°	Az dédoublé
	mg	mg	mg
Extrait de malt frais.....	7.24	13.52	6.28
4 p. c. d'extrait de la poudre brune	5.64	8.48	2.84
8 p. c. — — — —	10.92	16.08	5.16

On voit qu'un pouvoir fermentatif trypsique relativement grand s'est conservé pendant l'évaporation et le dessèchement prolongés. Mais les données ne suffisent pas pour déterminer l'étendue de l'affaiblissement. Comme, pendant l'évaporation, l'enzyme a trouvé moyen d'agir sur les matières albuminoïdes de l'extrait de malt en les dédoublant pour former des composés imprécipitables par l'acide tannique, les 8 p. c. d'extrait de malt contiennent une quantité d'azote correspondant, à peu

près, à la teneur en azote de l'extrait de malt primitif: l'affaiblissement n'aura été que très petit.

Tout compte fait, on voit que l'enzyme trypsique supporte très bien le dessèchement tant à des températures élevées qu'à des températures basses, et que, par conséquent, elle peut se trouver à l'état actif au malt touraillé comme aux préparations d'extrait de malt faites en évaporant à des températures basses. Il y a tout lieu de croire que l'enzyme pepsique de même supporte le dessèchement, s'étant toujours, jusqu'à présent, montrée plus résistante aux influences des facteurs extérieurs que l'enzyme trypsique. Mais je n'ai pas encore examiné cette question.

2° Nous avons vu qu'aucune des deux enzymes en solution ne supporte ni ébullition ni chauffage au-delà de 70° (v. p. 169 ss. et p. 241).

3° La congélation, au contraire, ne semble pas exercer d'influence nuisible, en tout cas sur l'enzyme trypsique, la seule que j'aie examinée. Il est plutôt possible, par une congélation partielle, de renforcer le pouvoir fermentatif protéolytique d'un extrait de malt, parce que ce n'est qu'une petite partie de l'enzyme qui entre dans la première partie congelée. Les essais suivants ont été faits avec trois extraits de malt différant d'âge. L'âge, cependant, n'a assurément pas exercé d'influence affaiblissante sur le pouvoir fermentatif à cause de la température basse (v. plus loin, p. 246). Mais il faut naturellement compter avec les différences individuelles des trois échantillons de malt.

(Essais nos. 76—87). Les extraits de malt sont préparés de 1 partie de malt vert + 2 parties d'eau. I est congelé complètement. De II, la moitié seulement est congelée. III n'est pas congelé du tout. La fusion se fait dans l'armoire glacière à 4°—5°. 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine.

	Age des extraits de malt	Az du liquide filtré de l'acide tannique		
		pour commencer	au bout de 2 heures à 50°	Az dédoublé
		mg	mg	mg
I {	a. moitié fondue la première	96 heures	9.30	15.32
	b. moitié fondue la dernière	96 —	3.48	4.84
II {	a. partie non congelée.....	48 —	7.76	13.52
	b. — congelée.....	48 —	2.30	3.38
III	point de congélation.....	24 —	6.64	11.72
				5.08

Donc, d'un extrait de malt complètement congelé c'est la partie qui, entre autres, contient l'enzyme trypsique, qui fond la première (I); c'est encore, d'après II, celle qui s'est congelée la dernière. Pourtant la moitié congelée la première (II b) d'un extrait de malt a aussi un pouvoir fermentatif trypsique faible, une partie correspondante de l'azote étant congelée.

4° On a examiné l'influence de la lumière aux essais que voici:

1^{re} Série (Essais nos. 895—914). 13 mars 1900. Le jour même de sa préparation, c'est à dire aussi tôt qu'une quantité suffisante aura passé par le filtre, on prend, d'un extrait de malt, 3 échantillons. L'un d'eux a été mis, sans délai, dans l'armoire glacière (dans l'obscurité, comme toujours). On verse les deux autres dans des flacons transparents qu'on place entre les carreaux doubles d'une fenêtre, à l'ouest, les y laissant de 3 h. 30 du soir jusqu'au coucher du soleil (à 6 h.). L'un des flacons est couvert d'un capuchon de carton, peint en noir et impénétrable aux rayons de la lumière. L'autre, tout ouvert, est placé sur le capuchon de carton pour que la température des deux flacons puisse être, autant que possible, la même.

	Az du liquide filtré		Az dé-doublé
	pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
	mg	mg	mg
Dans l'échantillon de l'armoire glacière	7.96	18.40	10.44
— — du flacon obscur....	6.44	16.84	10.40
— — du flacon clair.....	6.98 ¹⁾	16.00	9.02

Le ciel était, ce jour-là, particulièrement clair et sans nuages. Le lendemain, il en était de même. Les flacons sont restés, le lendemain, au même endroit jusqu'à 2 heures, donc à la lumière diffuse jusqu'à midi, et pendant deux heures à la lumière solaire directe. On mêle 10^{cc} des différents échantillons avec 10^{cc} d'une solution de protéine à 2 p. c. et l'on précipite par l'acide tannique pour commencer et au bout de deux heures, ayant laissé les mélanges au bain-marie à 47°.

Le même jour, 14 mars, une partie de l'échantillon laissé dans

¹⁾ Il faudrait s'attendre à trouver les chiffres de cette colonne presque les mêmes. Je ne saurai expliquer pourquoi il n'en est rien. Serait-ce dû à l'intervention de bactéries qui auraient fait d'azote amidé des composés précipitables par l'acide tannique?

l'armoire glacière pendant la nuit, a été placée à la lumière du jour, une autre partie à l'obscurité, comme plus haut, de 2 h. du soir jusqu'au lendemain, lorsqu'on s'en est servi pour les expériences. Voici ce que j'ai trouvé:

	Az du liquide filtré		Az dé-doublé
	pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
	mg	mg	mg
Dans l'échantillon du flacon obscur..	8.20	17.26	9 06
— — du flacon clair....	8.30	16.60	8.30

II^e Série (Essais nos. 2083—2090). 17 mai 1901. Un extrait de malt tout frais est placé dans des vases cylindriques étroits. L'un, couvert d'un capuchon de carton noir, est mis à une fenêtre, à l'ouest, de 3 h. $\frac{1}{2}$ du soir jusqu'au coucher du soleil (vers les 8 h.), et le lendemain, pendant quelques heures du matin, à une fenêtre, au sud, à la lumière solaire forte et directe. Comme le 13—14 mars, il faisait très beau: le ciel était clair et sans nuages. Pour exclure la végétation bactérienne, on a ajouté à chaque échantillon 4 gouttes de toluol. Avant et après les essais on précipite tant par le chlorure stanneux que par l'acide tannique:

	Précipitant	Az du filtrat		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 heures à 50°	
		mg	mg	mg
Dans l'échantillon du vase obscure	le chlor. stann.	12.88	35.08	22.20
— — — —	l'acide tann.	8.92	16.16	7.24
— — — clair	le chlor. stann.	12.72	34.24	21.52
— — — —	l'acide tann.	9.36	15.84	6.48

Les deux séries d'essais se confirment. Elles montrent que plusieurs heures de lumière solaire directe n'exercent qu'un effet minime — si effet il y a — d'affaiblissement sur le pouvoir fermentatif protéolytique, et que les deux enzymes, la pepsique et la trypsique, se comportent de même, ou à peu près, à cet égard. — Voilà un résultat d'importance pour les plantes sur pied très exposées à la lumière solaire, surtout à

l'âge jeune. Elles pourront donc, aussi au soleil, faire, sans retardation, la dissimilation de leur matières albuminoïdes. Autre chose est que celle-ci s'accuse tout particulièrement dans les plantules qui croissent à l'obscurité par l'entassement d'asparagine, de glutamine, et de substances semblables (Schulze): là, les conditions nécessaires pour la génération de matières protéiques par la combinaison des corps amidés avec les produits non azotés de l'assimilation chlorophyllienne font défaut.

5°. Pour l'influence des acides, des alcalis et des antiseptiques sur les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt voir plus haut III, 8 (p. 203 ss). Nous rappellerons seulement qu'en général l'enzyme trypsique se montre beaucoup plus sensible à l'influence de ces substances que l'enzyme pepsique.

6° Sous la notion d'âge nous comprenons un certain nombre de facteurs dont les effets ne se distinguent pas facilement. En disant d'une solution qu'elle est durable ou peu durable, nous entendons seulement indiquer sa force de résistance à des agents avec la présence desquels il faudra compter dans chaque cas particulier. Nommons, par exemple, tous les autres corps solubles qui se trouvent naturellement en présence d'enzymes et qu'en pratique il est impossible d'en séparer. Parmi ces corps, nous citerons les différents sels d'un extrait de malt, ou les composés formés par suite de l'action des enzymes mêmes. Avant tout, il faut y compter les enzymes elles-mêmes, qui pourront peut-être se détruire les unes les autres, ou se détruire elles-mêmes par l'autodigestion. (Ainsi on sait que l'enzyme protéolytique du suc de levûre détruit facilement la zymase par un acte de digestion). Il faut encore compter avec la présence de bactéries qui peuvent directement détruire les enzymes, ou bien former des produits d'assimilation et de dissimilation ou de fermentation qui agissent à leur détriment. — Pour exclure de telles actions, il faut procéder de l'une des deux manières suivantes: ou bien maintenir la solution d'enzyme à une température assez basse pour y supprimer toute transformation chimique, qu'elle soit causée par les enzymes elles-mêmes, par les bactéries ou par n'importe quel autre agent — si l'on y réussit complètement le pouvoir fermentatif pourra, sans doute, se conserver intact pendant un temps illimité — ou bien ajouter des substances qui, comme les antiseptiques, préviennent l'action nuisible des bactéries. Dans le dernier cas, il faut prendre en considération l'influence défavorable que pourra exercer sur l'enzyme l'antiseptique lui-même. En éliminant tous ces facteurs on fait disparaître, à mon avis, „l'influence de l'âge“ dont parlent si souvent les auteurs, quand même l'emploi

de ce terme pourra souvent être commode pour s'épargner l'énumération d'un grand nombre de facteurs sous-entendus.

Quant à mes expériences à l'égard de „l'influence de l'âge“, dans le sens du terme que je viens d'indiquer, sur les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt, j'ai indiqué plus haut (p. 151—52 et p. 226) l'espace de temps pendant lequel on peut conserver à l'extrait de malt le pouvoir fermentatif en ajoutant du toluol, qui affaiblit toujours un peu, ou en refroidissant à 0°. Plongé dans la glace, l'extrait de malt se conserve presque sans affaiblissement pendant, au moins, plus d'une semaine et, assurément, plus longtemps encore si on a soin de renouveler continuellement la glace. Au contraire, à 4°—5° (dans l'armoire glacière) une fermentation acide se produit au bout de quelques jours, le pouvoir fermentatif se perdant complètement si l'on n'écarte pas les bactéries par l'addition, par exemple, de toluol. Ainsi, par un traitement convenable, l'enzyme pepsique, en particulier, mais aussi l'enzyme trypsique se conservent assez bien en solution. Je n'ai pas examiné jusqu'à quel point l'enzyme pepsique se conserve à l'état solide en précipitant par l'alcool (pour l'enzyme trypsique v. p. 240 ss.).

3. Influence sur des matières protéiques diverses. Points de ressemblance avec la pepsine et la trypsine animales.

Peu à peu on a constaté que l'action de plusieurs enzymes n'est pas aussi spécifique qu'on le supposait d'abord, la même enzyme agissant quelquefois sur des corps assez peu rapprochés, à ce qu'il paraît, les uns des autres. Jusqu'à quel point ce fait nous autorise, comme le veut Emil Fischer, à conclure à un certain accord de la structure moléculaire de ces substances, c'est ce que je ne discuterai pas ici. Mais, en tout cas, il y a intérêt à réunir le plus grand nombre possible de données de ce genre. J'ai donc examiné la manière de se comporter des enzymes protéolytiques de l'extrait de malt vis-à-vis d'un nombre de matières protéiques, partie congénères, partie assez éloignées les unes des autres, du règne végétal, partie enfin, ce qui n'est pas le moins intéressant, d'origine animale. Pour être à même de juger l'extension du dédoublement, j'ai, à titre de comparaison, fait agir, en même temps, de la pepsine et de la trypsine animales sur les mêmes substances. Enfin, dans quelques cas isolés, j'ai aussi fait agir la pepsine animale sur les matières protéiques végétales. Ainsi, on a mêlé ici plusieurs questions qui pourraient bien demander chacune un traitement à part. Mais étant d'avis qu'elles s'éclaircissent les unes les autres, et désirant éviter des répétitions trop nombreuses je les traiterai ensemble.

A ces essais, il y a eu quelquefois des difficultés par suite des différences qui existent entre les points optima de la température et de la concentration d'acide et d'alcali des enzymes animales et les points correspondants des enzymes végétales. Comme, cependant, il est nécessaire, pour faire des comparaisons rationnelles, de faire agir les différentes enzymes aux conditions les plus favorables, j'ai dû, dans quelques-uns de mes essais, avoir égard à cette circonstance. La conséquence en est que les essais de la même série sont faits dans des conditions extérieures un peu différentes.

Ainsi qu'on verra des numéros d'essais, je vais présenter mes séries d'essais dans un ordre un peu différent de l'ordre chronologique auquel elles ont été faites.

I^e Série (Essais nos. 1341—1372). On y examine l'influence qu'exerce le même extrait de malt sur les matières albuminoïdes suivantes: les glutines de Kjeldahl de céréales diverses (v. p. 156—57), mais pour lesquelles je préfère employer le nom général de protéines; la légumine de pois, la caséine de commerce de Kahlbaum. Pour les préparations de protéine de froment, d'orge, de malt, je les ai faites moi-même de la manière indiquée p. 153. Mon collègue, M. Carl Pedersen, m'a gracieusement cédé deux préparations de protéine de seigle et d'avoine, ainsi que la légumine. De toutes ces substances j'ai fait des solutions à 2 p. c. dans de l'acide lactique à 0.4 p. c. En les laissant reposer 24 heures à la température ambiante, toutes se sont dissoutes excepté la protéine de malt, la légumine, la caséine. Celle-ci formait un dépôt léger, dont la liqueur surnageante était claire. La légumine formait une gelée épaisse et claire dans laquelle étaient dissimulés des moutons blancs. La protéine de malt, enfin, formait une émulsion opaque d'un brun jaunâtre, sans dépôt (cette préparation n'était pas toute pure). En chauffant au bain-marie, la légumine a donné une solution parfaitement limpide, la caséine une émulsion faible; la protéine de malt est restée telle qu'elle était avant. Comme à l'ordinaire, on emploie 10^{cc} d'un extrait de malt frais et 10^{cc} des solutions de matières protéiques. On fait précipiter pour commencer et au bout de 2 heures, à la température de 47°, par l'acide tannique. Ainsi les résultats ne se rapportent qu'au dédoublement trypsique. (V. tableau p. 249.)

Contre mon attente, c'est sur la protéine de malt que s'exerce l'action la plus faible (à moitié aussi grande que l'action sur la légumine), mais la cause en est peut-être l'impureté déjà nommée de la préparation. Mais la protéine d'orge aussi, très jolie préparation, n'occupe pas de position bien élevée. En effet, la caséine animale et difficilement soluble la dépasse de beaucoup; la protéine de froment

la laisse loin derrière elle. Voilà pourquoi cette dernière paraît un objet très bien choisi pour les recherches sur les actions protéolytiques de l'extrait de malt, sans parler du rendement très fort qu'on en obtient, comparé à celui que fournit la préparation des autres graines. Ce qui est intéressant c'est que les traits de beaucoup les plus grands sont donnés par la légumine, assez éloignée des céréales.

	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		Az dédoublé	
	pour commencer	au bout de 2 h. à 47°	total	de la protéine
	mg	mg	mg	mg
10 ^{cc} edm. + 10 ^{cc} d'ac. lactique à 0.4 p. c.	9.30	11.46	2.16	—
— — — de protéine de malt ...	8.90	16.12	7.22	5.06
— — — - — - seigle .	9.20	16.88	7.68	5.52
— — — - — d'orge	8.72	16.88	8.16	6.00
— — — - caséine	9.18	18.20	9.02	6.86
— — — - protéine d'avoine. .	9.24	19.22	9.98	7.82
— — — - — de froment.	9.04	20.04	11.00	8.84
— — — - légumine	8.92	21.58	12.66	10.50

Donc, l'enzyme trypsique de l'orge en germination, seule enzyme sur laquelle nous renseignent ces essais, est loin d'avoir une action spécifique et exclusive sur les matières albuminoïdes de l'orge. Son action, au contraire, est encore plus forte vis-à-vis d'une série d'autres matières albuminoïdes en partie assez éloignées et même d'origine animale. Il résultera des essais suivants qu'en dehors des substances déjà nommées, il y en a plusieurs autres qui se prêtent à cette action, telles que l'ovalbumine et la fibrine de bœuf. A certains égards, cette enzyme ne le cède pas aux enzymes d'origine animale (la pepsine, la trypsine). Il en est de même de l'enzyme pepsique de l'extrait de malt.

II^e Série (Essais nos. 931—942, 967—994). Je rapproche ici, pour les comparer, des essais faits en deux groupes avec des extraits de malt et des solutions de pepsine diverses (pepsine de Langebek). Les essais avec les extraits de malt sont faits à 47°, ceux avec la pepsine à 40°.

	Az du liquide filtré de la précipitation par l'acide tannique		Az dédoublé
	pour commencer	au bout de 2 heures à 47° ou 40°	
Essais nos. 931-942. Solution de pepsine à 5 p. c. ¹⁾	mg	mg	mg
Protéine de froment-HCl (à 0.36 p. m.)-edm.....	6.48	16.08	9.60
— — — — — -pepsine ..	35.64	43.48	7.84
— — — — — -acide lactique (à 2 p. m.)-edm...	6.48	16.42	9.94
— — — — — -pepsine	35.64	42.18	6.54
Essais nos. 967-994. Solution de pepsine à 2 p. c.			
Protéine-acide lactique (à 2 p. m.)-edm.	9.00	19.22	10.22
— — — — — -pepsine.....	16.94	19.42	2.48
Caséine — — — — — -edm.	9.00	18.24	9.24
— — — — — -pepsine.....	16.94	20.00	3.06
Protéine-HCl (à 0.9 p. m.)-edm.....	9.08	10.64	1.56
— — — — — -acide lactique (à 2 p. m.)-edm.	9.08	19.22	10.14
Protéine-HCl (à 0.9 p. m.)-pepsine	16.94	20.60	3.66
Caséine- — — — — —	16.94	27.66	10.72
Pepsine-HCl (à 0.9 p. m.) seuls.....	16.76	18.18	1.42
Edm.-acide lactique (à 2 p. m.) seuls.....	9.08	11.54	2.46

Quand même, vu les conditions expérimentales différentes, on n'est pas justifié en comparant directement ces essais, ils donnent, à plusieurs égards, d'intéressantes indications sur lesquelles j'attirerai l'attention. Des essais postérieurs viendront suppléer ceux-ci. Rappelons d'abord que ces essais, auxquels l'acide tannique seul sert de précipitant, ne nous renseignent que sur l'effet de l'enzyme trypsique de l'extrait de malt, tandis qu'on sait que ce n'est qu' lentement que la pepsine animale pousse le dédoublement au-delà des vraies peptones ou de

¹⁾ Les indications des concentrations d'acides du tableau n'ont pas une valeur absolue aux essais de pepsine les solutions aqueuses de pepsine réagissant toujours acide. En titrant avec de la phénol-phtaléine comme indicateur, on a neutralisé 10^{cc} d'une solution de pepsine à 2 p. c. par 2^{cc}.70 d'hydrate de sodium titré normal au 10^e. Aux essais nos. 931—942, auxquels la solution de pepsine était à 5 p. c., l'acidité s'est donc fortement augmentée. Aux essais nos. 967—994, auxquels les concentrations d'acide chlorhydrique étaient plus fortes encore, on aura peut-être déjà dépassé la limite d'acidité la plus favorable.

matières précipitables encore par l'acide tannique¹). Il ne faut donc pas s'étonner que j'aie eu des effets relativement faibles partout, même pour la caséine. — Il paraît que l'action d'une solution de pepsine à 5 p. c. est beaucoup plus forte que celle d'une solution à 2 p. c., résultat auquel il ne fallait guère s'attendre d'après les renseignements que nous donne généralement à ce sujet la littérature. Mais peut-être faut-il chercher, nous venons de le dire, l'explication dans l'acidité plus favorable des premiers essais; peut-être faut-il rapporter le trait plus grand à une autopeptonisation plus énergique, car c'est un fait qu'une autopeptonisation a lieu. Cependant, à la phase révélée ici les extraits de malt ont à tous les essais, tant à ceux avec la protéine qu'à ceux avec la caséine, agi avec plus de force que la pepsine, à part l'essai avec les caséine + pepsine + acide chlorhydrique (à 0.9 p. m.). A une concentration convenable d'acide, l'extrait de malt agit aussi énergiquement sur la caséine que sur la protéine de froment, qui est beaucoup moins fortement attaquée par la pepsine. On est encore frappé de la différence de l'action de la pepsine sur la caséine selon que la solution où l'action se passe contient de l'acide chlorhydrique ou de l'acide lactique: l'action est beaucoup plus faible dans le dernier cas. L'extrait de malt n'agit que très faiblement à l'acide chlorhydrique à 0.9 p. m., concentration très favorable, au contraire, à la pepsine.

Partie pour examiner l'influence qu'exerce l'extrait de malt sur encore une albumine, partie pour voir si la pepsine ne serait pas supérieure à l'extrait de malt aux phases antérieures de la protéolyse (révélées par d'autres précipitants que le tannin), on a fait les essais que voici:

III^e Série (Essais nos. 1487—1540). Comme autrefois, on se sert de protéine de froment et de caséine, mais celle-ci est une préparation de Merck, moins soluble et donnant toujours une émulsion très trouble contenant quelques flocons indissous. De plus, on se sert d'une préparation desséchée d'ovalbumine dont, cependant, la solution contenait à peine 2 p. c. On dissout la protéine de froment dans de l'acide lactique à 0.4 p. c., les deux autres dans de l'acide chlorhydrique à 0.1 p. c., les liquides à essayer contenant ainsi 0.2 p. c. d'acide lactique et 0.05 p. c. d'acide chlorhydrique. On emploie l'extrait de malt ordinaire et une solution à 2 p. c. de pepsine de Langebek. Tous les essais se font à la température de 45° qui se trouve au milieu de la température optima des deux solutions diastasiques.

¹) V. Salaskin: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXII, 592 (1901). D. Lawrow, ibid. XXXIII, 312 (1901). Leo Langstein: Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. I, 507 ss. (1902).

Comme précipitants, on se sert d'acide tannique et de chlorure mercurique (sublimé).

Voici d'abord quelques observations sur la précipitation par le sublimé¹⁾, dont je n'ai pas encore parlé. On emploie une solution presque saturée (à 5—7 p. c.) de chlorure mercurique. Comme celle-ci réagit fortement acide, il est nécessaire de neutraliser avant de précipiter, sans quoi la protéine de froment ne se précipite pas complètement. En prenant pour indicateur la phénol-phtaléine, on fait la neutralisation au moyen d'eau de chaux, qu'on ajoute goutte par goutte par une burette jusqu'à l'apparition du plus faible rouge. On emploie toujours 10^{cc} de la solution de sublimé. Le précipité se déposant vite la liqueur suspendue devient limpide. (Une série d'essais de contrôle m'ont démontré que, par ce procédé, on précipite toute la matière précipitable, de sorte que les liquides filtrés restaient clairs sans donner de précipités ultérieurs en ajoutant encore du sublimé).

Essais nos. 1487—1540	Pré- cipi- tant	Az du liquide filtré		Az dédou- blé
		pour com- mencer	au bout de 2 heures à 45°	
		mg	mg	mg
Protéine de froment-ac. lactique-edm....	Hg Cl ²	9.48	26.00	16.52
— — — — ...	tannin	8.90	20.40	11.50
— — — — pepsine	Hg Cl ²	22.96	35.82	12.86
— — — — —	tannin	16.06	20.90	4.84
Ovalbumine-H Cl-edm.....	Hg Cl ²	9.06	12.50	3.44
— — — —	tannin	9.30	13.62	4.32
— — — — pepsine	Hg Cl ²	21.36	26.34	4.98
— — — —	tannin	15.62	20.36	4.74
Caséine-H Cl-edm.....	Hg Cl ²	9.50	17.66	8.16
— — — —	tannin	9.50	17.02	7.52
— — — — pepsine	Hg Cl ²	22.90	35.22	12.32
— — — —	tannin	16.30	21.90	5.60

Ces essais font voir qu'à l'action qu'exerce sur la protéine de froment la pepsine, il se forme une quantité considérable de produits qui échappent à la précipitation par le sublimé mais que précipite le tannin (probablement des peptones). Aux essais avec l'extrait de malt, la différence entre ces deux précipitations est beaucoup moins grande.

¹⁾ V. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXVII, 413 (1898).

On obtient le même résultat des essais avec la caséine qui, en général dans cette série, est beaucoup plus susceptible de l'action de la pepsine que de celle de l'extrait de malt. L'ovalbumine semble être également résistante aux attaques des deux enzymes: il n'y a guère de différence entre ce qui échappe à l'une ou à l'autre des deux précipitations, à celle par le sublimé ou à celle par le tannin. L'intérêt principal de cette série d'essais se trouve dans les différences entre les précipitations par le sublimé et celles par le tannin: elles nous révèlent — c'est là un point auquel je vais revenir — des phases diverses de la protéolyse. Si on ne se sert comme précipitant que de l'acide tannique pour comparer les effets protéolytiques d'un extrait de malt et d'une préparation de pepsine, on sera facilement induit en erreur; de même que la supériorité générale de l'extrait de malt dans la phase révélée par ce précipitant ne permet aucune conclusion bien sûre sur le pouvoir fermentatif protéolytique des deux solutions. A cet égard, les essais suivants, auxquels on a fait la comparaison avec la trypsine animale pour ce que j'appelle la phase pepsique et la phase trypsique de la protéolyse, auront un intérêt général.

IV^e Série (Essais nos. 2339—2368). — A ces essais, on examine l'action d'un extrait de malt sur la fibrine de bœuf en milieu acide tant qu'en milieu alcalin. A titre de comparaison, je fais agir un extrait de pancréas (de la trypsine) sur la même substance en milieu alcalin. L'extrait de malt est préparé le jour même où on l'applique. Voici comment on le neutralise aux essais qui se font en milieu alcalin: Ayant trouvé que 10^{cc} d'extrait demandent 2^{cc}.4 d'hydrate de sodium titré normal au 10^e pour produire, par de la phénolphtaléine, une teinte rouge reconnaissable, on additionne à 97^{cc}.6 d'extrait de malt 2^{cc}.4 d'hydrate de sodium titré normal. Puis, on s'en sert tout de suite, sans enlever par filtration le précipité faible produit par la neutralisation. Pour la fibrine et l'extrait de pancréas, je les ai reçus le même jour, 13 décembre, par un grand froid, tout frais du laboratoire du professeur Bohr. Je m'en suis servi tout de suite à mes essais. J'ai eu deux échantillons de l'extrait aqueux de pancréas, dont l'un saturé de chloroforme. Celui-ci a servi aux essais prolongés (24 heures), l'autre, sans chloroforme, aux essais courts (2 heures). Les deux ont réagi alcalin. Avant de servir, la fibrine, se trouvant dans de l'eau de chloroforme, est pressée, rincée à l'eau à plusieurs reprises, pressée de nouveau et à la fin entre du papier à filtrer, enfin coupée en petits morceaux. On ne pèse pas ce qu'on en prend pour chaque essai, mais, par approximation, on en fait entrer la même quantité à tous les essais. On porte dans des fioles avec 10^{cc} d'acide lactique à 0.4 p. c. et avec 10^{cc} de carbonate de sodium

à 0.27 p. c. (liquide titré normal au 20^e, à peu près) respectivement. Comme on y ajoute 10^{cc} soit d'extrait de malt, soit d'extrait de pancréas, on obtient une concentration d'acide de 0.2 p. c. et une concentration d'alcali de 0.135 p. c. La fibrine, plongée dans l'acide lactique, se gonfle vite formant une gelée transparente. Celle, au contraire, mise dans la solution de carbonate de sodium reste rétrécie. — Les essais sont faits à la température de 47°. Les uns durent 2 heures; d'autres 24 heures. Tous les essais alcalins sont additionnés de toluol. Toutes les fioles sont bouchées pendant le temps d'essai. On précipite par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. Une colonne particulière du tableau suivant (v. p. 255) indique les changements visibles qu'a subis la fibrine à la fin des essais.

Il résulte de ces essais que les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt sont à même de dédoubler, sur une assez grande échelle, la fibrine de bœuf. Leur action dépasse même, quant aux produits de dédoublement tryptiques (que j'appellerai ici tout court azote amidé, par opposition à l'azote d'albumose, produits de dédoublement pepsiques), celle de l'enzyme pancréatique pendant les deux premières heures d'essai. Pour la formation d'albumoses, les enzymes protéolytiques du malt ne sont que peu inférieures à l'enzyme pancréatique. Leur action, il est vrai, se fait le mieux sentir en milieu acide, étant presque nulle en milieu alcalin, fait qui est contraire à l'affirmation, faite sans preuves de Windisch et Schellhorn¹⁾, suivant laquelle l'action de la pepsine de malt sur les matières protéiques d'origine animale se ferait le mieux en milieu alcalin. Au bout de 24 heures, cependant, la trypsine a formé de la fibrine beaucoup plus d'azote d'albumose et d'azote amidé que l'extrait de malt, mais, chose assez remarquable, celui-ci a aussi, au bout des 24 heures, formé relativement beaucoup plus d'azote amidé que d'azote d'albumose. Il semble que l'extrait de malt ne puisse dédoubler en albumoses qu'une certaine quantité de fibrine, moins grande que celle dédoublée par la trypsine, et que le rapport entre l'action pepsique et l'action tryptique est changé par le dédoublement ultérieur des albumoses.

En dehors de cette série d'essais, j'ai encore fait quelques expériences isolées assez intéressantes pour rechercher l'influence qu'exercent sur la fibrine l'extrait de malt et l'extrait pancréatique. Le 14 décembre, j'ai introduit 5 gr.8 de fibrine bien lavée dans 110^{cc} d'extrait de malt contenant 0.2 p. c. d'acide lactique. Puis, ayant couvert l'ex-

¹⁾ V. Windisch und Schellhorn: Wochenschr. für Brauerei XVII, 535 (1900) ou J. R. Green: „Die Enzyme“ übersetzt v. Windisch, p. 210, Anm. Berlin (1901).

	Pré- cipitant	Pour commencer		Au bout de 2 heures à 47°				Au bout de 24 heures à 47°					
		Az du liquide filtré	mg	Az du liquide filtré	Az dédoublé		Changements visibles de la fibrine	Az du liquide filtré	Az dédoublé		Changements visibles de la fibrine		
					total	de fi- brine			total	de fibrine			
edm.-fibr.-ac. lact..	SnCl ²	—	mg	19.04	mg	mg	{	la fibrine dis- soute en partie	29.73	mg	mg	{	la fibrine pour ainsi dire complètement dis- soute. Point de fila- ments, un petit dépôt.
— — —	Tannin	—	—	13.14	6.00	4.44			22.70	16.69	13.55		
edm.-ac. lact.	SnCl ²	13.04	—	14.60	5.74	2.74	{	la fibrine in- altérée	16.18	14.30	8.54	{	la fibrine inaltérée.
— — —	Tannin	8.40	—	11.40	1.56	—			14.16	3.14	—		
edm.-fibr.-soude ...	SnCl ²	—	—	11.88	0.40	(0.68)	{	une petite par- tie seulement de la fibrine dissoute	12.88	1.40	(1.48)	{	tous les filaments dissous. le liquide laiteux.
— — —	Tannin	—	—	7.64	0.44	0.24			8.80	1.60	1.04		
edm.-soude.	SnCl ²	11.48	—	11.20	(÷ 0.28)	—	{	une petite par- tie seulement de la fibrine dissoute	11.40	(÷ 0.08)	—	{	tous les filaments dissous. le liquide laiteux.
— — —	Tannin	7.20	—	7.40	0.20	—			7.76	(0.56)	—		
trypsine-fibr.-soude	SnCl ²	—	—	7.38	5.96	5.78	{	une petite par- tie seulement de la fibrine dissoute	36.40	35.28	35.04	{	tous les filaments dissous. le liquide laiteux.
— — —	Tannin	—	—	2.92	1.40	1.52			17.53	16.29	16.85		
trypsine-soude ...	SnCl ²	÷ chlf. 1.42	÷ chlf. 1.12	1.60	0.18	—	{	une petite par- tie seulement de la fibrine dissoute	1.36	0.24	—	{	tous les filaments dissous. le liquide laiteux.
— — —	Tannin	1.52	1.24	1.40	(÷ 0.12)	—			0.68	(÷ 0.56)	—		

trait d'une couche épaisse de toluol, je l'ai abandonné à lui-même à 42°—43° (A). Le même jour, des filaments fibrineux ont été introduits dans un extrait pancréatique à 0.12 p. c. de soude avec du chloroforme, à la même température (B). Le 16 décembre, les filaments fibrineux d'A étaient tombés en flocons qui, pour la plupart, s'étaient déposés sous la forme de précipité. En B, toute la fibrine était dissoute, et le liquide presque limpide. Au courant des jours suivants, le précipité d'A allait toujours en disparaissant sans avoir complètement disparu à la fin du mois de janvier de 1902. Le troisième jour, B était parfaitement limpide tout en donnant un mince dépôt blanchâtre. Les 16, 17, 19, 20, 26, 30 décembre, les 16 et 20 janvier, on a essayé si B donnait la réaction de tryptophane en acidulant avec de l'acide acétique et en ajoutant quelques gouttes de brome, mais toujours avec un résultat négatif: on n'obtenait qu'un précipité jaune et insoluble dans l'alcool amylique, sans teinte violette aucune. Mais lorsque, le 16 janvier, j'ai essayé la réaction aussi à l'extrait de malt contenant la fibrine et auquel je ne m'attendais pas à un résultat positif, il s'est produit une réaction de tryptophane extrêmement belle et très prononcée donnant avec de l'acide acétique et l'eau de brome une teinte violette foncée, absorbée par l'alcool amylique. Il m'est impossible d'expliquer pourquoi l'essai de la trypsine ne donnait pas cette réaction, mais si elle se montre d'une manière si prononcée à l'essai de l'extrait de malt, on est en droit d'y voir l'effet d'une action trypsique véritable, amenant la formation de la protéine-chromogène si caractéristique à la digestion trypsique.

4. Les produits de dédoublement protéolytiques.

La chimie organique moderne n'a guère de domaine où l'incertitude soit aussi grande qu'à la caractérisation et à la systématisation des matières protéiques diverses et de leurs produits de dédoublement primaires (albumoses, peptones). On ne sait guère ce qu'en chaque cas il faudra considérer comme matières protéiques proprement dites. On se demande si l'on n'a affaire qu'à une partie de la molécule d'albumine primitive, ou s'il s'agit d'un composé de celle-ci et d'une autre substance, un soi-disant groupe prosthétique ou chaîne latérale (A. Kossel¹⁾) de nature organique ou inorganique. La raison en est qu'on n'a aucun criterium sûr de la matière protéique pure, pas même dans

¹⁾ A. Kossel: Ueber den gegenwärtigen Stand der Eiweisschemie. Vortrag geh. vor der Deutsch. chem. Gesellsch. 1. Juni 1901. Ber. d. d. chem. Gesellsch. XXXIV, 32 (14. Okt. 1901).

les cas, assez fréquents aujourd'hui, où on peut la faire cristalliser. Ainsi différentes albumines, la sérumalbumine, l'ovalbumine, la lactalbumine forment des cristaux isomorphes (Wichmann¹), tandis que leur composition élémentaire diffère tellement que toute identité entre elles est hors de question. D'autre part, la composition élémentaire de cristaux de la même matière albuminoïde (l'oxyhémoglobine, l'ovalbumine, l'édestine du chènevis) présente quelquefois des variations tellement grandes qu'il n'y a pas moyen d'en tirer des conclusions sur la composition de la substance à l'état pur (Fr. N. Schulz²). Quelquefois même on ignore comment distinguer les vraies matières protéiques de leurs produits de dédoublement primaires.

Aussi se fonde-t-on, en ce moment, pour distinguer entre les divers groupes de matières albuminoïdes ou leurs produits de dédoublement, sur des propriétés plus ou moins constantes: 1° leur composition élémentaire, surtout leur teneur en azote (en soufre, en phosphore); 2° leurs propriétés physiques (solubilité, coagulabilité, conditions de précipitation, diffusibilité, pouvoir rotatoire, etc.); 3° leurs produits de dédoublement sous l'influence d'acides, d'alcalis, d'enzymes, etc.; 4° leur manière de se comporter vis-à-vis de précipitants chimiques; 5° leur réactions de coloration.

Si on désire connaître l'action qualitative d'une enzyme protéolytique, c'est à dire savoir quels sont les produits de dédoublement qui se forment pendant son action sur les matières albuminoïdes qu'elle est à même de transformer, on verra vite qu'il est difficile de donner une réponse quelque peu satisfaisante à cette question. D'abord, il est possible, vraisemblable même que son action sur les diverses matières protéiques (par exemple sur celles nommées plus haut) est quantitativement et qualitativement différente. Puis, on n'est jamais sûr que les matières protéiques dont on part, soient des individus chimiques à l'état pur. Enfin, tant qu'on n'aura pas produit l'enzyme même à l'état de pureté, une partie des produits trouvés (ainsi ceux qui se manifestent par des réactions de coloration déterminées) pourra provenir de la préparation d'enzyme même.

De plus, une protéolyse — comme celle traitée ici — qui conduit le dédoublement des matières albuminoïdes au-delà des peptones à la formation de bases hexoniques, amides, amines, etc., est une action extrêmement compliquée. Il est vrai qu'on y trouve des com-

¹) A. Wichmann: Ueber die Krystalformen der Albumine. Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVII, 592 (1899).

²) Fr. N. Schulz: Die Krystallisation von Eiweissstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweisschemie. Gustav Fischer. Jena. 1901.

posés beaucoup mieux caractérisés que les corps nommés tout à l'heure. En effet, pour un grand nombre d'entre eux on en connaît les formules constitutives, ils forment des cristaux typiques ou des combinaisons peu solubles. Mais il est parfaitement impossible, par les méthodes analytiques modernes, de faire simultanément à un essai de protéolyse des déterminations quantitatives et qualitatives de toutes ces substances ou même de quelques-unes d'entre elles. Il n'y a guère personne — moi-même moins que tout autre — qui soit assez présomptueux pour s'imaginer de pouvoir résoudre cette question. En cherchant de contribuer un peu à la solution du côté qualitatif de la question de la protéolyse c'est exprès que je me suis tracé les limites les plus étroites: au lieu de rechercher en détail quelles sont les substances caractéristiques produites pendant l'action des enzymes en question, je me suis borné à tâcher de les distinguer par groupes au moyen de l'emploi de précipitants divers ou de la dialyse. D'autre part, je n'ai guère attaché d'importance aux réactions de coloration pour la distinction des groupes qualitativement différents. Aussi ne me suis-je servi de cette méthode que par occasion et à côté d'autres méthodes.

Je n'ai point essayé de déterminer les produits de dédoublement très profonds cristallins en les préparant à l'état pur. Mais ce qui, pour moi, présente ici le plus grand intérêt théorique et pratique c'est d'abord de constater la quantité et la nature des produits de dédoublement primaires formés (albumoses, peptones), comparés à tous les autres composés pris ensemble (bases hexoniques, corps amidés, etc.), puis d'examiner les variations des rapports de tous ces composés, amenées par la variation des conditions expérimentales. Pour obtenir ces renseignements, je me suis servi: 1° de quelques-uns des précipitants qui, d'après les indications de la littérature, précipitent telle substance et ne précipitent pas telle autre; 2° de la diffusion.

Hâtons-nous d'ajouter que les savants sont loin d'être d'accord sur les substances précipitables par chaque précipitant, et que, naturellement, les conditions de précipitation jouent le plus grand rôle à cet égard. Mais que le sens que j'attribue à mes résultats soit vrai ou faux — ce qui leur donne de la valeur c'est, à mon avis, qu'autant que possible mes précipitations ont toujours été faites aux mêmes conditions, que je me suis toujours servi de la même matière albuminoïde (la protéine de froment) employant des extraits de malt préparés de la même manière, et qu'en variant les conditions de l'action de l'enzyme de la même série d'essais, j'ai déterminé quantitativement l'azote qui, au même temps, s'est soustrait à la précipitation par des précipitants divers. Mes résultats ont, en tout cas, ainsi une valeur relative.

A. Emploi simultané de plusieurs précipitants.

Dans ce qui précède nous avons cité des séries d'essais auxquelles on s'est servi, pour précipiter, de chlorure stanneux et d'acide tannique à la fois; une série à laquelle, en outre, on a employé du sulphate de zinc et de l'acétate uranique, ainsi que de la magnésie pour la distillation d'ammoniaque (v. p. 189—90); une série, enfin, où c'est le chlorure mercurique qui a servi de précipitant (p. 252). Tout en revenant, dans la suite, sur les résultats de ces essais je renvoie, pour les manipulations, aux parties précédentes.

Il me reste ici à décrire encore une méthode de précipitation, dont je n'ai pas parlé plus haut: la précipitation par l'acide phosphotungstique. Je me sers d'une solution de cette substance à 10 p. c. dans de l'acide chlorhydrique à 5 p. c. On commence par rechercher la quantité nécessaire pour opérer une précipitation complète dans l'extrait de malt et dans la solution de la protéine de froment de la concentration ordinaire. On voit que 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine de froment donnent la même précipitation complète par 10^{cc}, 20^{cc} ou 30^{cc} d'acide phosphotungstique: c'est à dire l'additionnement de cet acide au liquide filtré ne donne ni précipité ni opacité. Aussi emploie-t-on toujours 20^{cc} de la solution d'acide phosphotungstique. On étend d'eau, comme à l'ordinaire, jusqu'à 50^{cc}, et le dosage d'azote se fait pour la moitié du liquide filtré.

1^{ère} Série (Essais nos. 1373—1400): Précipitation par le sulfate de zinc, par l'acide tannique (tan.) et par l'acide phosphotungstique (ph.-tg.) dans 10^{cc} d'extrait de malt et dans 10^{cc} d'extrait de malt + 10^{cc} de solution de protéine de froment. Les précipitations sont faites au commencement de l'essai, et au bout de 2 heures à 47°:

Azote total de 10^{cc} d'edm. = 19^{mg},62.

	Précipitant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commencer	au bout de 2 heures à 47°	
10 ^{cc} d'edm.....	Zn SO ⁴	mg	mg	mg
— —	tan.	"	"	"
— —	ph.-tg.	9.68	12.62	2.94
— —	ph.-tg.	7.28	8.28	1.00
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot...	Zn SO ⁴	12.72	24.86	12.14
— — — — ..	tan.	9.66	19.46	9.80
— — — — ..	ph.-tg.	6.40	10.66	4.26

On voit donc que les trois précipitants précipitent des quantités très différentes de l'azote total. Mais avant d'en discuter le sens, je vais citer encore quelques autres essais.

II^e Série (Essais nos. 1405—1442). Mêmes précipitants qu'à la série précédente. Mais les essais sont faits à des températures différentes; ils sont arrêtés au bout de 3 heures:

Az total de 10^{cc} d'edm. = 19^{mg}.21.

	Précipi- tant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour com- mencer	au bout de 3 heures à la température de	
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot.	ZnSO ⁴	mg	mg	mg
— — — —	tan.	10.76	4 ⁰ { 11.96	1.20
— — — —	ph.-tg.	9.32	{ 9.46	0.14
— — — —	ph.-tg.	6.24	{ 6.40	0.16
— — — —	ZnSO ⁴	10.76	19 ⁰ { 14.20	3.44
— — — —	tan.	9.32	{ 11.42	2.10
— — — —	ph.-tg.	6.24	{ 6.80	0.56
— — — —	ZnSO ⁴	10.76	31 ⁰ { 19.24	8.48
— — — —	tan.	9.32	{ 16.04	6.72
— — — —	ph.-tg.	6.24	{ 9.74	3.50
— — — —	ZnSO ⁴	10.76	47 ⁰ { 25.64	14.88
— — — —	tan.	9.32	{ 21.94	12.62
— — — —	ph.-tg.	6.24	{ 12.88	6.64
— — — —	ZnSO ⁴	10.76	60 ⁰ { 20.16	9.40
— — — —	tan.	9.32	{ 17.02	7.70
— — — —	ph.-tg.	6.24	{ 10.44	4.20

On n'a pas construit de courbes de ces chiffres directement; mais on pourra comparer les planches XIII et XIV de la série suivante; on y trouvera les résultats des précipitations par l'acide phosphotungstique de cette série-ci, marqués par une ligne ponctuée.

III^e Série (Essais nos. 1561—1612). On y opère aux mêmes températures qu'à la II^e série en se servant, cependant, de deux autres précipitants: du chlorure stanneux et du sublimé, ainsi que du sulfate de zinc et de l'acide tannique, mais sans se servir de l'acide phosphotungstique. La durée est de 3 heures.

Az total de 10^{cc} de solution de protéine: 33^{mg}.22
 — — — 10^{cc} d'edm.: 20^{mg}.40
 en tout: 53^{mg}.62

	Précipi- tant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour com- mencer	au bout de 3 heures à la température de	
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot.	Sn Cl ²	mg 15.84	mg 21.18	mg 5.34
— — — —	Hg Cl ²	9.86	4° {	1.54
— — — —	Zn SO ⁴	11.60		0.50
— — — —	tan.	10.04		0.50
— — — —	Sn Cl ²	15.84	19° {	13.06
— — — —	Hg Cl ²	9.86		6.16
— — — —	Zn SO ⁴	11.60		2.96
— — — —	tan.	10.04	31° {	3.24
— — — —	Sn Cl ²	15.84		24.28
— — — —	Hg Cl ²	9.86		13.94
— — — —	Zn SO ⁴	11.60	47° {	10.16
— — — —	tan.	10.04		10.30
— — — —	Sn Cl ²	15.84		28.02
— — — —	Hg Cl ²	9.86	60° {	19.84
— — — —	Zn SO ⁴	11.60		16.02
— — — —	tan.	10.04		14.90
— — — —	Sn Cl ²	15.84	60° {	27.14
— — — —	Hg Cl ²	9.86		14.90
— — — —	Zn SO ⁴	11.60		12.00
— — — —	tan.	10.04		9.94

Ces résultats sont aussi représentés graphiquement sur les planches XIII et XIV. Sur la première, les courbes sont dressées d'après les chiffres de la quatrième colonne du tableau (Az du liquide filtré au bout de 3 heures). On voit ainsi comment, à un moment donné, les différents précipitants divisent l'azote du liquide à essayer total à des températures variées. L'autre planche nous montre la quantité d'azote, exprimée en chiffres absolus, dédoublée, pendant le temps d'essai, aux températures variées, de manière à se soustraire à la précipitation par les mêmes précipitants (v. les chiffres de la cinquième colonne du tableau). Mais que les résultats s'expriment de manière ou d'autre, on verra que la courbe du sublimé, celle du sulfate de zinc et celle de l'acide tannique courent, pour ainsi dire, parallèlement et à peu de distance l'une de l'autre. La courbe du chlorure stanneux, au contraire, passe très loin des autres. De 47°—60°, elle passe parallèlement à l'axe des abscisses. Ce fait indique que le temps d'essai relativement long (3 heures) a suffi pour que, même à la température

moins favorable de 60°, la réaction ait pu aller aussi loin qu'à la température plus favorable de 47°, à laquelle elle serait essentiellement finie avant l'expiration des 3 heures (comp. essais p. 263). Les extraits de malt de cette série et ceux de la série précédente ayant, à peu près, la même teneur en azote et le même pouvoir fermentatif si l'on regarde les précipitations par le sulfate de zinc et l'acide tannique, on est en droit, en quelque façon, d'introduire, à titre de comparaison, la courbe de l'acide phosphotungstique de la II^e Série, ainsi qu'on l'a fait aux planches XIII et XIV. On a ainsi une vue claire de la manière dont les différents précipitants divisent l'azote d'un liquide à essayer comme celui employé ici, après que les enzymes protéolytiques y ont exercé leur action pendant un certain temps, à des températures diverses.

Ce qui, à cette série d'essais, offre le plus d'intérêt, à mon avis, c'est la hauteur à laquelle atteint la courbe de chlorure stanneux (à 47° et à 60°), ainsi que la grande distance entre cette courbe et les autres courbes. Quelques questions se sont alors présentées que j'eus envie d'approfondir: 1° l'action révélée par la courbe de chlorure stanneux a-t-elle atteint son maximum au bout des 3 heures et, sous ce chef, combien de l'azote encore précipitable à ce moment faut-il croire originaire de la protéine, combien de l'extrait de malt employé? 2° un temps d'essai plus long aura-t-il pour effet de rapprocher de plus en plus les différentes courbes? Les deux séries suivantes contribueront à éclaircir ces points:

IV^e Série (Essais nos. 1613—1668). En dehors d'essais avec le mélange ordinaire de protéine de froment et d'extrait de malt, on a fait des essais d'autodigestion avec des extraits de malt seuls, additionnés de leur volume d'eau à 0.4 p. c. d'acide lactique. Comme précipitants on ne se sert que de chlorure stanneux et de sulfate de zinc. Les températures sont les mêmes qu'à la série précédente (seulement 33° au lieu de 31°). On arrête les essais au bout de trois heures. A la température de 47°, cependant, j'en ai fait durer quelques-uns 4 et 5 heures.

Les résultats sont indiqués au tableau ci-dessous (p. 263) et par les courbes de la Pl. XV. Voici ce qu'ils nous apprennent:

L'action révélée par la précipitation par le chlorure stanneux a réellement atteint son maximum, à très peu près, au bout des 3 heures (v., du reste, la série suivante). Plus de la moitié (3^{mg}.66 sur 6^{mg}.84) de l'azote précipitable encore au bout de 5 heures se trouve dans l'extrait de malt même. Du reste, les transformations dans ce sens qui se sont faites de la 3^e à la 5^e heure ne dépassent pas ce qu'on pourra attribuer aux erreurs expérimentales (à la 3^e heure: 15^{mg}.24; à la 4 heure: 15^{mg}.24; à la 5^e heure: 15^{mg}.44). La petite distance

qu'il y a entre les courbes de chlorure stanneux et celles de sulfate de zinc aux essais avec les extraits de malt seuls, démontrent qu'aux essais avec la protéine de froment les substances qu'il faut mesurer par cette distance, doivent être formées, pour la plupart, de cette protéine.

Az total de 10^{cc} de solution de protéine: 33^{mg}.74

— — - 10^{cc} d'edm.: 19^{mg}.10

total: 52^{mg}.84

	Préci- pitant	Az du liquide filtré		Az dédoublé
		pour commen- cer	au bout de 3 heures à la tem- pérature de	
		mg	mg	mg
10 ^{cc} d'edm. + 10 ^{cc} de prot.	Sn Cl ²	16.20	40 { 22.38	6.18
— — — —	Zn SO ⁴	10.44		0.76
— — — —	Sn Cl ²	16.20	190 { 29.72	13.52
— — — —	Zn SO ⁴	10.44		1.58
— — — —	Sn Cl ²	16.20	330 { 42.86	26.66
— — — —	Zn SO ⁴	10.44		10.92
— — — —	Sn Cl ²	16.20	470 { 45.04	28.84
— — — —	Zn SO ⁴	10.44		10.92
— — — —	Sn Cl ²	16.20	470 { 44.84 (4 hs.)	(28.64) (4 hs.)
— — — —	Sn Cl ²	16.20		(29.80) (5 -)
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	600 { 26.60	16.16
— — — —	Sn Cl ²	16.20		24.12
— — — —	Zn SO ⁴	10.44	600 { 18.60	8.16
10 ^{cc} d'edm.	Sn Cl ²	12.70	40 { 13.06	0.36
— —	Zn SO ⁴	10.20		0.32
— —	Sn Cl ²	12.70	190 { 13.52	0.82
— —	Zn SO ⁴	10.20		1.18
— —	Sn Cl ²	12.70	330 { 13.48	0.78
— —	Zn SO ⁴	10.20		2.56
— —	Sn Cl ²	12.70	470 { 15.24	2.54
— —	Sn Cl ²	12.70		(2.54) (4 hs.)
— —	Sn Cl ²	12.70	470 { 15.44 (5 -)	(2.74) (5 -)
— —	Zn SO ⁴	10.20		3.60
— —	Sn Cl ²	12.70	600 { 14.24	1.54
— —	Zn SO ⁴	10.20		2.50

V^e Série (Essais nos. 1711—1776). La marche des essais a été décrite en détail p. 189—91. Nous nous bornons ici à rappeler que les précipitants étaient le chlorure stanneux, le sulfate de zinc, l'acide

tannique et l'acétate uranique, et qu'on avait distillé de l'ammoniaque par de la magnésie calcinée. Les essais s'étendaient de 1 à 48 heures. Pour plus de clarté, je réimprime le tableau des résultats renvoyant à la Pl. V et à l'explication partielle des essais, donnée p. 191—92.

Az total de 10^{cc} de solution de protéine: 31^{mg}.46
 — — — 10^{cc} d'edm.: 18^{mg}.84
 total: 50^{mg}.30

Nos. 1711—1776	Chlorure stanneux		Sulfate de zinc		Acide tannique		Acétate uranique		Magnésie	
	Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes		Az en milli-grammes	
	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du filtrat	dédouble par heure	du liquide distillé	formé par heure
Au bout de 0 heures	15.62	—	11.60	—	10.48	—	9.64	—	1.06	—
— - 1 —	40.40	24.78	18.64	7.04	16.96	6.48	20.12	10.48	1.35	0.29
— - 2 —	42.36	1.96	24.28	5.64	21.16	4.20	24.84	4.72	—	—
— - 3 —	43.76	1.40	25.24	0.96	23.52	2.36	26.74	1.90	2.84	0.75
— - 4 —	43.72	÷0.04	28.54	3.30	24.80	1.28	27.24	0.50	—	—
— - 5 —	43.76	0.04	30.04	1.50	25.80	1.00	28.80	1.56	—	—
— - 6 —	44.68	0.92	31.52	1.48	27.04	1.24	29.00	0.20	3.42	0.19
— - 9 —	45.16	0.16	34.12	0.87	31.16	1.37	32.20	1.07	—	—
— - 12 —	45.28	0.04	37.96	1.28	34.96	1.27	33.92	0.57	4.48	0.17
— - 24 —	45.76	0.04	40.44	0.21	38.04	0.26	—	—	4.76	0.02
— - 48 —	45.32	÷0.02	43.88	0.15	41.08	0.13	38.28	0.12	5.20	0.02

B. Essais de diffusion.

Voici ce que j'ai essayé de déterminer: 1° la quantité d'azote diffusible, formée par suite de l'action d'un extrait de malt sur la protéine de froment, pendant un temps donné, à la température optimale des enzymes; 2° la différence de l'azote non diffusible avant et après cette action (la protéolyse) à l'égard du pouvoir de coagulation et vis-à-vis de dissolvants tels que l'eau et l'acide lactique ou de précipitants tels que le chlorure stanneux et l'acide tannique.

Voici la marche de l'essai: dans un extrait de malt frais et dans une solution de protéine on dose l'azote total et l'azote qui, dès le commencement, se soustrait aux précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On prend deux portions de 50^{cc} d'extrait de malt + de 50^{cc} de solution de protéine chaque. On chauffe l'une d'elles (l'échantillon passif) tout de suite, l'autre (l'échantillon actif) au

bout de 3 heures seulement, pendant environ 10 minutes, à 90°, pour détruire les enzymes protéolytiques. Aux deux échantillons, le chauffage fait séparer de la matière albuminoïde coagulée, provenant de l'extrait de malt. On place chaque échantillon dans une vessie de poisson bien étanche, qu'on suspend dans de grands vases cylindriques (d'un litre), remplis d'eau distillée jusqu'au niveau de la surface du liquide à l'intérieur de la vessie. La compression du contenu de la vessie rend d'autant plus grande la membrane de diffusion. Pour prévenir le développement bactérien, on verse dans la vessie de l'aldéhyde formique, opération qu'on répète chaque fois qu'on change l'eau distillée des vases cylindriques, ce qui se fait, généralement, tous les deux jours. On recueille soigneusement les liquides dialysés. On les évapore dans des capsules plates après l'addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Enfin, on en dose l'azote¹⁾. La dialyse ayant duré du 17 au 31 mai (1901), on ouvre les vessies en les coupant pour en retirer le contenu, ce qui se fait sans difficulté. On filtre les deux échantillons: le filtrat de l'échantillon actif est limpide comme de l'eau; celui de l'échantillon passif est opalisant; il ne traverse que lentement le filtre. On dilue à un volume déterminé (350^{cc}); puis on fait les dosages cités plus bas²⁾. Le contenu non dissous est traité, en chauffant, par 100^{cc} d'acide lactique à 4 p. c. Une partie des deux échantillons se dissout ainsi; mais relativement peu de l'échantillon actif. Dans ces solutions acidulées d'acide lactique on fait les

¹⁾ Ne connaissant pas d'avance la quantité d'azote des premiers dialysata, mais supposant qu'elle était trop grande pour convenir à la méthode de Kjeldahl, j'ai opéré de la façon suivante: on fait digérer, pendant 7 heures, le résidu de l'évaporation avec 20^{cc} d'acide sulfurique concentré et 6 spatules d'oxyde cuivrique. On oxyde en ajoutant 5—6 spatules de permanganate de potassium. Le contenu des fioles se fige en formant une masse solide d'un gris rouge qui, plus tard, ne se fait dissoudre dans l'eau qu'en chauffant. Jetée sur un filtre, la solution passe dans une fiole jaugée de 200^{cc}. Le liquide filtré est clair et d'une teinte faiblement verdâtre (de manganates). Après avoir soigneusement lavé les oxydes manganiques restés sur le filtre, on remplit jusqu'au trait. Pour les dosages de l'azote, on prend 2 × 50^{cc} du filtrat. On reporte le liquide filtré aux oxydes manganiques dans la fiole qui a servi à la digestion avec l'acide sulfurique concentré. On ajoute quelques gouttes de cet acide et de l'acide oxalique solide. Le liquide, devenu clair, est distillé avec de l'hydrate de sodium: les oxydes manganiques ne contiennent pas d'azote.

²⁾ Ou n'est pas en droit d'attribuer de valeur exacte aux précipitations faites dans cette solution fortement diluée, les conditions de précipitation étant tout autres qu'à l'ordinaire. Ceci est le cas surtout pour la précipitation par le chlorure stanneux.

dosages de l'azote total et de la quantité d'azote qui échappe à la précipitation par le chlorure stanneux et par l'acide tannique. On dose l'azote des résidus insolubles dans l'acide lactique avec celui des filtres (lavés) employés.

Voici les résultats des essais:

Le liquide à essayer contenait à l'origine:

en 10 ^{cc} d'extrait de malt	18 ^{mg} .46 d'Az,	soit: en 50 ^{cc} d'extrait	92 ^{mg} .30 d'Az
en 10 ^{cc} de solut. de prot.	30 ^{mg} .30	— — — 50 ^{cc}	— 151 ^{mg} .50 —
			total en 100 ^{cc} d'extrait 243 ^{mg} .80 d'Az

De cette quantité on a précipité par le chlorure stanneux	173 ^{mg} .80	—
— — — — — l'acide tannique . . .	199 ^{mg} .20	—
— — — ont diffusé au courant de quinze jours	60 ^{mg} .92	—

Nous venons de dire, p. 264—65, qu'une portion de 100^{cc} (50^{cc} d'edm. + 50^{cc} de prot.) a été chauffée, pendant 10 minutes, à 90° (l'échantillon passif). Une autre portion, toute pareille, a été chauffée de la même manière, mais seulement après avoir été laissée à 50° pendant 3 heures (l'échantillon actif). Puis, les deux échantillons ont été soumis à la dialyse pendant quinze jours.

Voici la marche de la dialyse:

					à l'échantillon passif	à l'échantillon actif
Quantités diffusées du 15 au 17 mai					44 ^{mg} .16 d'Az	84 ^{mg} .96 d'Az
— — — 17 — 19 —					9 ^{mg} .00 —	25 ^{mg} .96 —
— — — 19 — 21 —					2 ^{mg} .74 —	9 ^{mg} .20 —
— — — 21 — 23 —					1 ^{mg} .52 —	5 ^{mg} .85 —
— — — 23 — 25 —					1 ^{mg} .10 —	4 ^{mg} .40 —
— — — 25 — 29 —				(4 × 24 hs)	1 ^{mg} .44 —	5 ^{mg} .92 —
— — — 29 — 31 —					0 ^{mg} .96 —	2 ^{mg} .80 —
					total 60 ^{mg} .92 d'Az	139 ^{mg} .09 d'Az

Ainsi la dialyse n'est pas menée à bout, ce que — au point de vue théorique — elle ne serait qu'après un espace de temps infini. C'est surtout de l'échantillon actif qu'une quantité sensible d'azote aurait encore diffusé, si on avait fait continuer la dialyse.

Si l'on construit les courbes de ces deux séries de chiffres (v. Pl. XVI), on verra qu'elles seront presque parallèles. Elles permettraient de calculer, approximativement, la quantité d'azote diffusible, restée aux vessies à l'arrêt de l'essai. Mais en s'en tenant aux chiffres cités, trouvés directement, on verra que la quantité d'azote, rendue diffusible au courant des 3 heures, à 50°, est considérable

(78^{mg}.07). Réduite au volume du liquide à essayer ordinaire (20^{cc}), elle sera égale à 15^{mg}.61 d'azote ou à la quantité, au moins, qui, pendant le même temps, se soustrait à la précipitation par l'acide tannique (v. par exemple, le tableau p. 261).

En dosant l'azote, resté aux vessies à l'arrêt de la dialyse, on trouve:

	à l'échantillon passif mg	à l'échantillon actif mg
Az soluble dans l'eau, mais non diffusible	92.40	65.10
- insoluble — — , soluble dans l'acide lactique	24.40	2.88
- — — — , insoluble — — —	53.60	22.48
	170.40	90.46
en y ajoutant l'Az diffusible	60.92	138.99
on aura en tout	231.32	229.45 ¹⁾

Ces chiffres font voir que, pendant la protéolyse, une quantité considérable de l'azote se trouvant à l'origine au liquide à essayer à l'état soluble, mais non diffusible, est devenue diffusible, et que l'azote, originairement coagulable, et, après la coagulation (en chauffant à 90^o, pendant 10 minutes), insoluble dans l'eau et dans l'acide lactique, a été changé en azote soluble et non coagulable.

Voici les résultats des précipitations faites (après la dialyse), nous venons de le dire, par le chlorure stanneux et par l'acide tannique aux parties du contenu des vessies se trouvant déjà en solution ou qu'on a dissoutes en les traitant par l'acide lactique:

	la précipitation par le chlorure l'ac.de stanneux tannique	
A l'échantillon passif:	donne	
	mg	mg
de 92 ^{mg} .40 d'Az, soluble dans l'eau, non diffusible...	11.76	86.52
- 24 ^{mg} .40 — insoluble — — , soluble dans l'a-		
cide lactique	19.12	23.12
A l'échantillon actif:		
de 65 ^{mg} .10 d'Az, soluble dans l'eau, non diffusible...	6.30	60.62
- 2 ^{mg} .88 — insoluble — — , soluble dans l'a-		
cide lactique	1.76	2.88

¹⁾ Si ces deux chiffres ne s'accordent pas avec le chiffre de l'azote total de la série primitive (243^{mg}.80), il faut se rappeler le grand nombre de sources d'erreurs provenant du grand nombre de déterminations de petites parties des diverses fractions. Toutes ces petites erreurs monteront bien aux 10^{mg}—12^{mg} qui font défaut. D'avance on ne pourrait pas s'attendre à un accord plus grand.

La dilution très grande (v. p. 265) ayant totalement changé les conditions de précipitation il ne faut pas, sans doute, attribuer aux chiffres trouvés une valeur trop grande. Il me semble, cependant, intéressant de constater que l'acide tannique précipite presque complètement tout l'azote soluble qui n'est pas sorti par diffusion. Les différences pourraient bien correspondre, à peu près, à la quantité d'azote qui, quoique diffusible, n'était pas encore sortie par diffusion au moment de l'arrêt de la dialyse.

Les renseignements sur la nature des produits de dédoublement protéolytiques que nous donnent tous ces essais de précipitation et de diffusion, nous permettraient, sans doute, de tirer des conclusions assez importantes de mes essais, rapprochés des résultats auxquels sont arrivés d'autres investigateurs à l'égard de la séparation de substances, ou de groupes de substances divers, au moyen des méthodes employées ici. Mais la littérature vaste qui ne contient, malheureusement, que trop de contradictions, vous rappelle à la prudence, quand il est question de tirer des conclusions. Si quelque savant a cru trouver dans un précipitant une méthode apte à séparer certaines substances, un autre savant n'a pas tardé à paraître, croyant pouvoir affirmer que ce précipitant divise d'après des lignes de démarcation tout autres si, par exemple, on se sert d'une autre substance comme objet d'expérience, ou si les conditions de précipitation varient en quelque point. Or, comme la protéine de froment, la matière protéique qui fait l'objet de mes essais, n'a pas été examinée à fond au sujet des produits de dédoublement qu'elle fournit sous l'action d'agents divers, je suis d'avis que le moment n'est pas encore venu de faire des comparaisons étendues et détaillées entre mes résultats et ceux que d'autres ont trouvés à l'égard d'autres matières albuminoïdes en se servant des mêmes précipitants que moi. Je me bornerai donc, en groupant les produits de dédoublement protéolytiques, à tracer quelques lignes de démarcation, en m'appuyant essentiellement sur les points sur lesquels on est généralement d'accord.

Quant à l'emploi du chlorure stanneux comme précipitant, on n'a rien publié que je sache, à ce sujet, que ce qu'a communiqué Schjerring dans une série de mémoires¹⁾. C'est, du reste, à mon avis le savant qui a examiné à fond, avec le plus de soin et avec le plus de système, la valeur de différents précipitants pour opérer la séparation des matières albuminoïdes et de leurs produits de dédoublement, tout

¹⁾ A la Fresenius' Zeitschr. f. anal. Chemie. Voir les citations p. 162.

particulièrement là où il est question de tracer les lignes de démarcation entre leurs groupes principaux. Je me bornerai donc, pour la plupart du temps, à citer les indications de ce savant, quand même je ne me sens pas d'accord avec lui sur tous les points.

Le chlorure stanneux ne précipite, d'après Schjerning, que les matières albuminoïdes proprement dites, et encore pas toutes ces matières, en supposant que les termes dont il se sert d'Albumine I et d'Albumine II ne couvrent que celles-là, l'Albumine II n'étant pas précipitable. Si, comme je l'ai dit aux pages 155 et 162, en parlant de la préparation de protéine de froment dont je me sers, il n'y a eu que 95 p. c. de précipités, il faudrait peut-être expliquer ce fait par la supposition que la préparation n'était pas uniforme, mais qu'elle contenait aussi 5 p. c. d'autres substances. Naturellement, il est hors de question que, pendant la protéolyse, une albumine proprement dite se dédouble en une autre albumine. Si l'albumine se soustrait, peu à peu, à la précipitation par le chlorure stanneux, la cause en est un dédoublement qui est, sans doute, aux premiers stades, une hydrolyse. Il n'y a pas là formation de syntonines¹⁾. Ce qui le montre c'est que ce dédoublement ne se fait pas aux températures au-dessus de 70° (v. p. 173). Je n'ose affirmer qu'à partir du moment où le chlorure stanneux ne précipite plus, nous soyons arrivés à la formation d'albumoses, quoique je sois d'avis qu'on pourrait aussi bien se servir de ce terme que d'un autre, tant que les albumoses ne sont pas mieux caractérisées. Sous cette réserve, je dirai dans la suite — comme je l'ai fait une ou deux fois dans ce qui précède — que les courbes de chlorure stanneux tracent la ligne de démarcation entre les matières albuminoïdes proprement dites et les albumoses. S'il en est ainsi, le chlorure stanneux et le sulfate de zinc, l'autre précipitant dont on s'est servi assez souvent dans ces essais, nous auront fourni les moyens de mesurer directement et, ainsi, de suivre la formation d'albumoses pendant la protéolyse. En effet, à ce que je sais, tous les savants sont d'accord pour admettre que le sulfate de zinc en solution saturée distingue, tout comme les sulfates d'ammonium et de magnésium, les albumoses des vraies peptones, ou plutôt qu'on distingue ces substances par leur manière de se comporter vis-à-vis de ces précipitants qui ne précipitent pas les vraies peptones.

C'est A. Bömer²⁾ qui, la première fois en 1895 seul et, plus

¹⁾ D'après O. Cohnheim (*Chemie der Eiweisskörper*, Braunschweig 1900, p. 88) les syntonines ou acidalbumines donnent les mêmes réactions de précipitation et de coloration que les matières albuminoïdes proprement dites.

²⁾ A. Bömer: *Zeitschr. für analytische Chemie* XXXIV, 562 (1895).

tard, conjointement avec K. Baumann¹⁾, a montré cet accord entre le sulfate d'ammonium et le sulfate de zinc dans leur rapport aux albumoses. Ceci est d'une importance d'autant plus grande qu'en se servant du sulfate de zinc on évite de faire la correction d'azote qui est la conséquence de l'emploi du sulfate d'ammonium. Plus tard, les indications de Bömer ont été confirmées par E. Zunz²⁾. De même Schjerning³⁾ a obtenu les mêmes résultats en employant le sulfate de zinc et le sulfate de magnésium. Aujourd'hui plusieurs savants se servent du sulfate de zinc qui, en ce moment, est sur le point de prendre la place du sulfate d'ammonium aux dosages d'albumoses.

Le désaccord, au contraire, est plus grand sur la valeur du sublimé. Suivant W. Kühne⁴⁾ et R. Neumeister⁵⁾, par exemple, il précipite complètement tous les produits de dédoublement de nature protéique, y compris les peptones. Suivant Schjerning⁶⁾, il entraîne aussi les sels ammoniacaux d'acides organiques. Mais comme aux essais que j'ai faits⁷⁾ il a donné des précipitations moins complètes que le sulfate de zinc, ne précipitant même pas toutes les albumoses, je n'ose pas, des indications de la littérature, tirer de conclusions sur la nature de l'azote qu'il précipite.

La littérature n'est pas plus riche en renseignements sur la valeur de la précipitation par l'acide tannique. J. Sebelien⁸⁾ est, je crois, celui qui a traité ce précipitant le plus à fond. Il se sert (d'après Almén⁹⁾) d'une solution de 4^{gr} de tannin en 190^{cc} d'alcool à 40—50 p. c. additionné de 8^{cc} d'acide acétique à 25 p. c. Il donne comme résultat de ses recherches, entre autre, ce qui suit: „Aussi complète qu'est la précipitation par l'acide tannique dans les solutions de matières albuminoïdes proprement dites aussi peu complète est-elle quand on a affaire aux matières de la nature des peptones tant aux vraies peptones qu'aux albumoses¹⁰⁾“, et encore: „la peptone pure se dissout complètement dans l'acide tannique en excès.“ Toute bien

¹⁾ A. Bömer und K. Baumann: Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genussmittel, I, 106 (1898).

²⁾ E. Zunz: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVII. 219 (1899) et XXVIII, 132 (1899).

³⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXV, 296 (1896).

⁴⁾ W. Kühne: Zeitschr. f. Biologie XXII, 423 (1885).

⁵⁾ Rich. Neumeister: ibid. XXVI, 234 (1890).

⁶⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXIX, 553 (1900).

⁷⁾ J'y ai suivi la méthode de Schjerning, neutralisant avec de l'eau de chaux avant la précipitation.

⁸⁾ J. Sebelien: Danske Vidensk. Selskabs Oversigt 1888 p. 81—126 et Zeitschr. f. physiol. Chemie XIII, 142 (1888).

⁹⁾ Almén: Upsala läkara förenings förhandlingar, 1870.

¹⁰⁾ J. Sebelien: Videnskabernes Selskabs Oversigt 1888, p. 94.

fondée que soit cette observation pour les substances avec lesquelles a opéré Sebelien (produits de dédoublement d'ovalbumine, de caseïne, de lactalbumine), ces résultats ne se laissent guère généraliser. J'ai observé moi-même que l'acide tannique en excès redissout une partie du précipité d'un extrait de levûre (levûre soumise à l'autodigestion contenant un grand nombre de produits de dédoublement protéolytiques). Mais les essais que j'ai faits pour trouver les limites approximatives des précipitations par l'acide tannique (pour ces essais v. p. 157—60) ont clairement démontré que, dans le cas en question (les produits de dédoublement de la protéine de froment), aucune partie de l'azote une fois précipité ne se redissout, pas même dans un grand excès d'acide tannique. Ceci ne tient pas à ce que j'ai employé une solution aqueuse d'acide tannique (à 5 p. c.): c'est ce qui résulte des essais déjà nommés avec l'extrait de levûre, où la même solution a servi.

Contrairement encore à ce que pense Sebelien, je suis d'avis que l'acide tannique précipite assez complètement tant les albumoses que les peptones, celles, en tout cas, avec lesquelles j'ai opéré. Un coup d'œil sur les courbes (Pls. XIII et XIV) montre que l'acide tannique précipite toujours une quantité plus grande que celle précipitée par le sulfate de zinc, et une comparaison avec les précipitations par l'acétate uranique, auxquelles je reviendrai tout à l'heure, fait croire qu'il faut regarder que la précipitation par l'acide tannique indique la ligne de démarcation entre les deux groupes de dédoublement de la protéine de froment et de l'extrait de malt: les produits de dédoublement encore de nature protéique (produits pepsiques) et ceux plus profonds (les trypsiques). Cette considération est encore supportée par mes essais de dialyse (v. p. 267), auxquels l'acide tannique précipite, pour ainsi dire, tout l'azote en solution mais qui n'est pas sorti par diffusion de la vessie.

Il faut dire, cependant, que Schjerning¹⁾ qui, entre autre, a opéré aussi avec du moût (mais non pas. c'est vrai, avec un extrait de malt vert et de la protéine de froment) se déclare d'accord avec Sebelien, étant d'avis que, quantitativement, l'acide tannique ne précipite que des matières albuminoïdes proprement dites. — Ce que je peux prouver incontestablement c'est que l'assertion qui veut que l'acide tannique en excès redissolve ce qui a été déjà précipité, n'est pas exacte pour mes essais. Mais, autrement, ceux-ci ne fournissent pas la preuve exacte de la précipitation de toutes les albumoses et de toutes les peptones, quoiqu'il me semble que la marche de mes courbes,

¹⁾ H. Schjerning: Zeitschr. für anal. Chemie XXXIX, 562 (1900).

surtout si on les compare à d'autres courbes de précipitation, parle fortement en faveur d'une telle supposition. Mais on ne peut guère douter que les courbes d'acide tannique ne découvrent une phase relativement profonde de la protéolyse et qui se trouve tout près de la limite entre les peptones et les produits de dédoublement de nature non protéique.

D'après Schjerning¹⁾, l'acétate uranique précipite tous les composés de nature protéique en progressant à partir des peptones, et encore, en présence d'une grande quantité de phosphates, quelques substances de nature non protéique telles que l'asparagine, l'arginine, la piperazine. Aux essais (nos. 1711—1776, v. p. 264) auxquels je me suis servi de ce précipitant, le courbe d'acétate uranique (v. Pl. V) coïncide, pendant les 3—4 premières heures, à peu près, avec la courbe de sulfate de zinc; elle est plus hautement placée (la précipitation est moins grande) que la courbe d'acide tannique. Au bout de trois heures et demie, elle s'incline en descendant de la courbe de sulfate de zinc; au bout de 10 heures environ, elle vient couper la courbe d'acide tannique qui, tout le temps, est presque parallèle à la courbe de sulfate de zinc; enfin, au bout de 48 heures, elle se trouve autant au-dessous de la courbe d'acide tannique que celle-ci est alors au-dessous de la courbe de sulfate de zinc. L'extrait de malt contient un certain nombre de phosphates, mais le moût en contient autant. D'après Schjerning²⁾, la quantité des phosphates de l'extrait de malt n'est pas assez grande pour amener la précipitation de corps non protéiques: en général, l'acétate uranique tracera la ligne de démarcation entre ceux-ci et les peptones. S'il en est ainsi, et quand même un petit nombre de corps amidés et de bases hexoniques se précipitent, la précipitation par l'acétate uranique séparera, à peu près, tout comme la précipitation par l'acide tannique, les produits de dédoublement se trouvant au-dessus et au-dessous des peptones.

C'est une supposition générale³⁾ que l'acide phosphotungstique, outre les corps protéiques, précipite plusieurs produits de dédoublement plus profonds (bases hexoniques, monoamines, ammoniacque, etc.). Aussi ai-je trouvé la courbe de l'acide phosphotungstique située beaucoup plus bas que les courbes de tous les autres précipitants employés, et encore tellement au-dessous de la courbe d'acide tannique que la différence ne pourra pas provenir de l'ammoniacque seule, mais qu'elle doit être attribuée aussi aux autres produits de dédoublements cristallins.

¹⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXIX, 545 (1900).

²⁾ H. Schjerning: Zeitschr. f. anal. Chemie XXXIX, 556 (1900).

³⁾ V., entre autre, Fr. Kutscher: Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI, 215 (1900).

La distillation par la magnésie renseignera sur la quantité d'azote dédoublé en ammoniacque. En effet, la distillation dure trop peu de temps (10 minutes) pour que la magnésie employée ait pu faire distiller de l'azote qui n'y fût pas d'avance sous forme d'ammoniacque.

D'après ce qui précède, on saurait déterminer, au moyen de précipitants divers, combien, pendant une protéolyse, il se forme d'albumoses (la différence des précipitations par le chlorure stanneux et le sulfate de zinc), de peptones (la différence entre le sulfate de zinc et l'acide tannique ou l'acétate uranique), de produits de dédoublement plus profonds (corps amidés, bases hexoniques, ammoniacque, etc.: ce qui se soustrait à la précipitation par l'acide tannique, ou par l'acétate uranique). Enfin, l'emploi fréquent et simultané que j'ai fait plus haut du chlorure stanneux et de l'acide tannique aurait servi à trouver des expressions approximatives des actions pepsique et trypsique (dans le sens dont je me sers de ces termes) pendant la protéolyse.

Si donc on regarde une série d'essais tels que les essais nos. 1711—1776 (v. p. 264 et Pl. V) à laquelle on a suivi la protéolyse, pendant 48 heures, au moyen de quatre précipitants différents et de la distillation par la magnésie, on est frappé de l'intensité et de la rapidité de la formation d'albumoses, qui a atteint son maximum au bout de 3—4 heures en même temps que les peptones ne paraissent qu'en petit nombre. En effet, elles ne semblent se montrer que comme une formation de transition à un dédoublement plus profond et qui se continue jusqu'à ce que tout l'azote, transformable par cette action, soit dédoublé de manière à se soustraire à la précipitation par l'acide tannique aussi bien que par l'acétate uranique, tandis qu'en même temps des quantités considérables se sont transformées en ammoniacque.

Les essais, faits à des températures diverses, montrent encore que les différentes actions se passent toujours aux mêmes rapports, à peu près, entre elles les différentes courbes de précipitation étant presque parallèles. La courbe de chlorure stanneux seule paraît dévier un peu des autres, ce qui provient, nous l'avons dit, de ce que la durée (3 heures) de l'essai a été un peu trop longue pour faire la détermination de cette courbe, dont le parcours exact a été déterminé avant à une durée plus courte (v. p. 173). Ce qui est important, c'est que la formation d'albumoses est vive déjà aux températures très basses de 4° et de 19°, tandis que les autres actions ne prennent l'essor qu'au-delà de 19°—20°. Aux essais avec l'extrait de malt seul (sans protéine de froment), il n'y a qu'une très petite distance entre la courbe de chlorure stanneux et la courbe de sulfate de zinc, distance

que des températures plus favorables restreignent encore davantage (v. essais nos. 1613—1668, Pl. XV). Ceci fait supposer que, déjà pendant la germination, la plupart des matières azotées de l'extrait de malt ont atteint, ou à peu près, le point de dédoublement auquel, en général, elles peuvent arriver; et que, du moins au bout de 3 heures, à une température favorable à la protéolyse, il y aura très peu d'albumoses et de peptones par suite du dédoublement ultérieur de celles-ci. —

Les essais de diffusion semblent confirmer, d'une manière brillante, les essais de précipitation. Ils servent d'appui aux conclusions que j'ai tirées de ces derniers. Au commencement de l'essai il y a, en 100^{cc} de liquide à essayer, 243^{mg}.80 d'azote total, dont 70^{mg} échappant à la précipitation par le chlorure stanneux (provenant surtout des 50^{cc} d'extrait de malt qui contiennent 92^{mg}.30 d'azote total). Au bout de 3 heures, à 50°, le liquide à essayer a subi un changement tel qu'au courant de quinze jours l'échantillon actif fait passer par diffusion 78^{mg}.07 de plus que l'échantillon passif. Au même temps, une autre partie de l'azote, sans doute encore plus grande celle-là (un dosage exact a été impossible dans ce cas) a subi un dédoublement de sorte qu'elle n'est plus précipitée par le chlorure stanneux, mais précipitée presque complètement par l'acide tannique. Ce qui sort par diffusion sera donc, pour la plupart du temps, des composés cristallins avec un petit nombre de peptones, tandis que les albumoses seront surtout retenues à la vessie.

V.

Première apparition et formation des enzymes.

1. Stade de germination.

Suivant Windisch et Schellhorn¹⁾, l'orge crue („rohe Gerste“) contient déjà, en petite quantité, une enzyme protéolytique, et l'orge mal recueillie ou riche en matières protéiques en contient des quantités notables. Pendant le mouillage, aucune augmentation sensible de la teneur en enzyme n'a lieu, mais elle se fait dès le commencement de la germination, allant en croissant jusqu'à ce que la plantule soit verte. La formation d'enzyme se fait plus vite aux orges riches en matières protéiques qu'à celles qui sont pauvres en ces substances.

¹⁾ Windisch und Schellhorn: Wochenschr. für Brauerei XVII, 452 (1900).

Ayant, à plusieurs reprises, cherché en vain, au moyen de la précipitation par l'acide tannique, de constater une action d'enzyme protéolytique dans l'orge crue, j'ai fait une série d'essais assez longue pour trouver le stade du maltage où apparaît cette action. Je n'y ai employé que la précipitation par l'acide tannique. Je n'ai donc suivi que le développement de l'enzyme trypsique. Peut-être serais-je arrivé à des résultats pareils à ceux de Windisch et Schellhorn si je m'étais servi d'une autre méthode (v. plus loin, p. 279: Proenzymes).

J'ai pris mes échantillons à la malterie pneumatique de la brasserie de Gamle Carlsberg en trois parties, les 6, 12, 18 novembre 1900, mais toujours en avérant que c'était le même échantillon d'orge (marque „Kerteminde“, poids hollandais 115) à des stades de germination divers.

Voici comment on a pris les échantillons:

Le 6 novembre, échantillons

O. de grains séchés à l'air.

I de grains au bout de 24 hs. de trempé (5 nov. à 11 h. jusqu'au 6 nov. à 11 h.)

II — — - 48 - — (4 — — — 6 — —)

III — — - 72 - — (3 — — — 6 — —)

directement après la sortie des bacs de la trempé)

IV — — - 24 - de germin. (2 nov. à 11 h. jusqu'au 6 nov. à 11 h.)

V — — - 48 - — (1 — — — 6 — —)

Le 12 novembre.

VI de grains au bout de 72 - — (6 — — — 12 — —)

VII — — - 96 - — (5 — — — 12 — —)

VIII — — - 120 - — (4 — — — 12 — —)

IX — — - 144 - — (3 — — — 12 — —)

X — — - 168 - — (2 — — — 12 — —)

XI — — - 192 - —

Comme, à l'ordinaire, on interrompt la germination à la malterie au neuvième jour, on a, pour la faire continuer dans ce cas-ci, mis les échantillons dans des tamis. On a enfoncé ceux-ci dans les tas de malt, de manière à les faire traverser par la même quantité d'air que celle qui passe à travers tout l'autre malt. De plus, les tamis ont été retournés aux mêmes heures que l'autre malt. La germination s'est continuée ainsi encore pendant 120 heures. On a pris des échantillons

XII de grain au bout de 216 hs. de germ. (9 nov. à 11 h. jusqu'au 18 nov. à 11 h.)							
XIII	—	—	240	-	(8	—	18
XIV	—	—	264	-	(7	—	18
XV	—	—	288	-	(6	—	18
XVI	—	—	312	-	(5	—	18

La richesse en eau et en matières sèches varie, naturellement, beaucoup d'un échantillon à l'autre. Aussi a-t-il été nécessaire d'en faire la détermination pour chaque échantillon. Voici le procédé employé: on met les échantillons humides, sortis des bacs de la trempe, sur un entonnoir avec du papier à filtrer, les couvrant d'une plaque de verre. Aussitôt que l'eau se sera égouttée on pèse la quantité de grains entiers qui doivent servir au dosage des matières sèches. On fait celui-ci comme à l'ordinaire en chauffant dans le vide à 105°, jusqu'à ce que le poids ne change plus.

Mais pour avoir un extrait aqueux propre à servir, on a dû traiter les différents échantillons de manières un peu variées le concassage ordinaire au hachoir ne pouvant servir à tous. Le grain séché à l'air a été moulu en poudre fine. Les échantillons II—IV ont d'abord passé trois fois par un hachoir, puis on les a ultérieurement écrasés et pilés en les travaillant bien dans un mortier. Les échantillons V et VI étant déjà, après avoir passé par le hachoir, à l'état de bouillie n'ont pas été ultérieurement écrasés. Le restant des échantillons a, par ce traitement, pris la même consistance que les matériaux avec lesquels j'opère généralement en préparant mes extraits de malt.

Pour rendre, autant que possible, également „forts“ les extraits, il a fallu ajouter des quantités diverses d'eau aux divers échantillons. J'ai toujours ajouté la quantité qui, d'après mes calculs, était trois fois la quantité de matières sèches de l'échantillon me basant, pour mon calcul, sur des dosages antérieurs semblables. Après être remués à plusieurs reprises, les échantillons sont placés dans l'armoire glacière jusqu'au lendemain. Puis on remue encore quelques fois. Les échantillons II—IV sont pressés à la presse. Les autres sont jetés de suite sur des filtres. Pour chaque extrait, on fait deux essais parallèles sur l'influence qu'ils exercent sur une solution de protéine acidulée d'acide lactique, en agissant pendant 2 heures à 47°. Avant et après cette durée, on précipite par l'acide tannique. Pour chaque extrait, on détermine encore l'azote total de 10^{cc} ainsi que l'azote qui se soustrait à la précipitation par l'acide tannique. Ainsi que font voir les chiffres cités, la force des différents extraits varie beaucoup par rapport à la teneur en azote. Pour faire la comparaison de leur pouvoir fermentatif protéolytique, il a été nécessaire de le calculer d'après la même

teneur en matières sèches ou en azote. Il me semble le plus naturel de prendre pour base de la comparaison la teneur en azote. Aussi au tableau ci-dessous ai-je tout calculé comme pour un extrait de malt contenant, en 10^{cc}, 15^{mg} d'azote total, quantité trouvée à l'extrait de malt vert tout fait, ce qui, sans doute, a augmenté démesurément, pour les extraits peu riches en azote, les erreurs de titrage. On verra les résultats par le tableau suivant et, graphiquement, à la Pl. XVII.

Essais nos. 1239—1340	eau	en 10 ^{cc} d'extrait		en 10 ^{cc} d'extrait + 10 ^{cc} de prot.	Az dédoublé	
		Az total	Az du filtrat	Az du filtrat après 2 hs. à 47°	trouvé directe- ment	calculé pour un extr. de malt cont. 15mg d'Az en 10 ^{cc}
	p. c.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.
0 grains séchés à l'air..	16.37	9.68	2.88	2.92	0.04	0.06
I mouillage de 24 hs...	39.39	3.80	1.92	2.08	0.16	0.63
II — - 48 - ..	43.17	3.88	1.82	2.08	0.26	1.00
III — - 72 - ..	44.91	3.78	1.96	1.90	(÷ 0.06)	(÷ 0.24)
IV germination de 24 hs.	45.58	4.45	2.26	2.52	0.26	0.87
V — - 48 -	45.96	6.34	3.12	3.36	0.24	0.57
VI — - 72 -	45.92	6.50	2.96	3.20	0.24	0.55
VII — - 96 -	47.96	10.54	5.40	7.58	2.18	3.10
VIII — - 120 -	47.79	14.18	7.46	12.56	5.10	5.40
IX — - 144 -	48.10	15.17	7.68	14.64	6.96	6.87
X — - 168 -	48.42	14.87	7.74	13.78	6.04	6.09
XI — - 192 -	49.35	15.00	7.22	13.98	6.76	6.75
XII — - 216 -	50.40	14.58	7.08	14.48	7.40	7.59
XIII — - 240 -	47.51	14.48	6.70	13.00	6.30	6.51
XIV — - 264 -	50.30	14.68	7.48	14.40	6.92	7.05
XV — - 288 -	59.82	{ 14.02 14.64	7.26	13.48	6.22	6.69
XVI — - 312 -	56.64	13.56	7.10	13.52	6.42	7.08

Donc, dans notre échantillon d'orge, il ne s'est montré de pouvoir fermentatif protéolytique (trypsique) sensible qu'au quatrième jour de germination, après les trois jours de mouillage. Mais il se manifeste alors avec tant d'énergie que déjà au sixième jour de germination, il aura presque atteint son maximum, se maintenant assez constant jusqu'au treizième jour de germination, c-à-d. tout le temps qu'on en a suivi la marche. A la méthode de maltage dont on se sert, c'est, en

général, justement au quatrième jour de germination, à peu près, que la germination commence à aller bon train: les radicules poussent vite, la respiration se fait vive, le tas de malt se chauffe, la saccharification s'avive aussi.

Parmi les chiffres du tableau, ceux de la deuxième et de la troisième colonnes présentent aussi de l'intérêt. Si l'azote total, extrait de l'orge séchée à l'air, dépasse tant celui des échantillons trempés et des échantillons provenant des premiers jours de germination, cela tient, sans doute, exclusivement, à la division plus fine au premier cas. Cependant, l'orge séchée à l'air rend relativement beaucoup moins de l'azote soluble, de celui qui échappe à la précipitation par l'acide tannique: on en a la même quantité absolue que donne l'échantillon du troisième jour de germination. La raison en est simplement que ces substances se trouvent en très petite quantité, tant que les enzymes protéolytiques n'ont pas agi dans le grain même. Du reste, on est frappé de ce que, à tous les essais sauf le premier, le rapport entre l'azote total et l'azote imprécipitable par le tannin est près de 1 : 2, ce que j'ai constaté presque toujours, aussi pour les extraits de malt avec lesquels j'ai opéré ailleurs. On voit donc que ce rapport ne change pas, quand même la germination se continue 5 jours au-delà du stade auquel le malt vert est à terme. L'explication en est probablement qu'il est impossible aux enzymes protéolytiques de doubler beaucoup plus de l'azote en présence, ce qu'ont montré aussi les essais fréquents d'autodigestion que j'ai faits avec des extraits de malt.

L'augmentation de la teneur en eau et la diminution des matières sèches pendant le mouillage et la germination — par suite, en grande partie, de la respiration — sont des faits bien connus. Les chiffres que j'ai trouvés à ce sujet s'accordent bien, je crois, à ceux trouvés par d'autres.

Si, comme l'indiquent Windisch et Schellhorn et comme je le considère assez probable, les différentes orges varient beaucoup, on pourrait trouver des courbes tout autres que celle que j'ai tracée ici. Celle-ci ne prétend aussi à autre chose qu'à représenter un type, et encore un type qui n'indique que la marche du pouvoir fermentatif trypsique. Peut-être que l'enzyme pepsique apparaît à un stade bien antérieur. En effet, les essais que nous allons communiquer tout à l'heure, montrent une action notable déjà au grain d'orge non germé.

Il serait très intéressant de suivre les changements anatomiques du grain d'orge en examinant les tissus les plus riches en matière protéique, les cellules d'aleurone, pendant la germination pour découvrir, si possible, quel est l'endroit où apparaissent les enzymes

protéolytiques: l'embryon, les cellules d'aleurone ou ailleurs. C'est ce que j'ai essayé aussi sans réussir cependant à mener à fin mes recherches d'après le plan que j'avais fait. Comme résultat essentiel j'ai pu confirmer ce que H. T. Brown et G. Harris Morris¹⁾ communiquent à ce sujet dans leur magnifique travail: „Researches of the germination of some of the gramineæ“.

Simultanément avec l'entrée de la protéolyse vive, on aurait dû s'attendre à des changements correspondants aux couches des cellules d'aleurone. Mais ceci ne paraît pas être le cas. D'après Brown et Morris²⁾, les premiers signes de changements ne se font voir que lorsque la plumule aura dépassé la pointe du grain de 4^{mm}—5^{mm}: alors les granules d'aleurone perdent leur contour sphérique bien dessiné, leurs bords devenant irréguliers, et les parois cellulaires qui étaient très transparentes, commencent à montrer des signes de stratification. Même lorsque la plumule aura atteint une longueur d'environ 100^{mm} et que les autres cellules de l'endosperme seront presque vides d'amidon, des cellules d'aleurone pourront être intactes formant des séries cohérentes. En preuve de leur résistance à des enzymes protéolytiques ils observent, d'après Aimé Girard, que des cellules d'aleurone de froment pourront passer par le tube digestif de mammifères sans se changer.

Dans quelques sections que j'ai examinées, j'ai trouvé, au septième jour de germination, les deux couches d'aleurone extérieures parfaitement intactes et toutes pleines, tandis que la couche intérieure était fortement attaquée et, en quelques endroits, avait presque disparu.

Quelques essais projetés de culture d'embryons d'orge isolés, auxquels je me servais d'orges nues, mises à ma disposition par M. le professeur Westermann, n'ont pas été accomplis non plus, parce que j'étais trop engagé dans d'autres essais. Mais il y a, sur ce terrain, des problèmes anatomico-physiologiques extrêmement intéressants et qu'il ne paraît pas impossible de résoudre. J'espère y revenir un jour.

2. Proenzymes.

Quand même le grain d'orge mûr et non germé ne contient pas d'enzymes protéolytiques, il serait possible que leurs proferments, les proenzymes, ou substances zymogènes, y existent et qu'au moyen de quelque agent soi-disant zymoplastique (acide, température, etc.), celles-ci fussent capables de prendre l'état actif.

¹⁾ Brown and Morris: Journal of the chem. Society, Vol. LVII, 458—528 (1890).

²⁾ l. c. p. 473.

Plusieurs de ces proenzymes, telles que la propepsine et la prochymosine sont bien connues. On sait qu'elles se trouvent dans l'estomac des mammifères et qu'on est en état de les séparer des enzymes actives. Ainsi la propepsine résiste, contrairement à ce qui est le cas pour la pepsine, à l'action des alcalis faibles: on peut l'extraire par une solution de soude et la rendre active en ajoutant un acide (Langley et Edkins¹), Glaessner²). Vines³) pense aussi avoir trouvé aux cruches des népenthés une proenzyme qui n'agit protéolytiquement que par un acide: de même I. Reynolds Green⁴) pense avoir trouvé quelque chose de semblable aux graines en repos de *Lupinus hirsutus*, un extrait glycérinien de celles-ci ne devenant protéolytiquement actif qu'après avoir été traité par un acide étendu en chauffant légèrement.

Déterminé par ces indications, j'ai fait l'essai suivant: Le 6 novembre 1901, on moule un lot d'orge assez finement pour pouvoir en prendre des échantillons uniformes.

On les fait digérer de manières diverses:

- | | | | | | |
|-------|-------------------|------------------|---|-------------------|--|
| no. 1 | 100 ^{gr} | de farine d'orge | + | 300 ^{cc} | d'eau (fo-aq, 35°) |
| - 2 | — | — | — | + | 300 ^{cc} d'acide lactique à 0.2 p. c. (fo-lact., 35°) |
| - 3 | — | — | — | + | 300 ^{cc} Na ² CO ³ normal au 1/100 (fo-Na ² CO ³ , 35°) |
| - 4 | — | — | — | + | 200 ^{cc} de glycérine + 100 ^{cc} d'eau (fo-glyc., 35°) |

Chaque échantillon est additionné de toluol en abondance. On les agite fréquemment après les avoir placés, à 3 h. du soir, dans des gobelets qu'on met dans un bain-marie qui, ce jour-là, montrait 29°. On les y laisse jusqu'au lendemain à 10 h. 1/2, la température étant alors montée à 35°. Pour empêcher l'évaporation, les gobelets sont couverts de plaques de verre bien ajustées. — Par ce procédé, on pourrait, s'il y avait des substances zymogènes, s'attendre soit à les extraire, soit à les rendre actives (par l'influence de l'acide et de la température). Comme essais témoins on place deux échantillons dans l'armoire glacière, à 5°.

¹) Langley and Edkins: Pepsinogen and pepsin. Journ. of Physiology, III, 246 (1886).

²) Karl Glaessner: Ueber die Vorstufen der Magenfermente, Beitr. z. chem. Physiologie und Pathologie, I, 1 (1901).

³) Sidney-Vines: The proteolytic enzyme of Nepenthes. Annals of Botany XI, 563 (1897).

⁴) Green: On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. Philos. Transactions t. 178, B. 39 (1887). — On vegetable ferments. Ann. of Botany, Vol. VII, 83 (1893). — The soluble ferments and fermentation. London 1899, p. 207.

no. 5 100^{gr} de farine d'orge + 300^{cc} d'eau (fo-aq., 5°)

- 6 — — — — + 300^{cc} d'acide lactique à 0.2 p. c. (fo-lact., 5°)

Dans ces deux cas, il était à croire que les proenzymes, s'il y en avait, ne seraient pas rendues actives; mais que s'il y avait des enzymes actives dans cet échantillon d'orge elles seraient extraites à froid.

Le 7 novembre à 10 h. $\frac{1}{2}$ du matin, lorsqu'on a agité les différents échantillons, un dégagement d'air très vif — causé par une fermentation — s'ensuivit au no. 1. Au no. 3, la farine s'était soulevée. L'agitation donna lieu à un dégagement d'air très vif, accompagné d'une odeur extrêmement désagréable comme d'une fermentation butyrique, mêlée avec de la putréfaction. Ainsi, à la température élevée, le toluol n'avait pas été à même d'empêcher le développement de microbes dans ces échantillons. Aux nos. 2 et 4, pas de signe visible de fermentation. Les nos. 5 et 6 étaient aussi restés parfaitement frais.

A 11 h., tous les échantillons sont filtrés. Le premier liquide filtré trouble est rejeté sur le filtre, mais, à l'exception des nos. 5 et 6, aucun échantillon ne donne de filtrat complètement clair. Le filtrat du no. 3 ayant gardé l'odeur fétide, on ne le fait pas entrer aux essais suivants.

On ajoute aux autres liquides filtrés 10^{cc} de solution de protéine de froment dans de l'acide lactique à 0.2 p. c. pour les extraits contenant déjà cet acide; à 0.4 p. c. pour les autres, de sorte que la concentration d'acide lactique de tous les liquides à essayer soit 0.2 p. c. Comme précipitant on se sert du chlorure stanneux et de l'acide tanique. On dose l'azote avant d'avoir abandonné à eux-mêmes les liquides, à 50°, pendant 2 heures, et après. Dans ces conditions, une enzyme toute formée, s'il en existait, devait se faire reconnaître à ces essais. La solution de protéine contenait, en 10^{cc}, 32^{mg}.76 d'azote. Pour les autres déterminations, voir le tableau suivant.

Ces premiers essais donnant des traits si faibles d'activité protéolytique, on les a répétés le 14 novembre après avoir abandonné à eux-mêmes les extraits, à la température ambiante (18°), additionnés de toluol en abondance. On ne précipite qu'avec le chlorure stanneux. Tous les échantillons semblent inaltérés 7 jours durant. Peut-être qu'alors une transformation de proenzyme en enzyme s'était faite aux extraits acides. Au tableau, ces dernières déterminations sont jointes aux autres, mais entre parenthèses.

Essais nos. { 2201-2230 2241-2251	Az total	Az du liquide filtré du chlorure stanneux		Az du liquide filtré de l'a- cide tannique		Az dédoublé échappant à la précipitation par	
		pour commencer	au bout de 2 heures à 50°	pour com- mencer	au bout de 2 hs. à 50°	du chlorure stanneux	de l'acide tannique
		mg	mg	mg	mg	mg	mg
fo-aq., 35°	13.02	—	—	—	—	—	—
fo-aq-prot., 35°	—	7 nov. { 9.88	7 nov. { 10.46	4.84	4.94	7 nov. { 0.58	0.10
		14 — { 10.92	14 — { 11.56	—	—	14 — { 0.64	—
fo-lact., 35° . . .	16.18	—	—	—	—	—	—
fo-lact-prot., 35°	—	7 — { 12.90	7 — { 14.24	6.90	7.30	7 — { 1.34	0.40
		14 — { 14.76	14 — { 16.02	—	—	14 — { 1.26	—
fo-glyc., 35° . . .	11.40	—	—	—	—	—	—
fo-glyc-prot., 35°	—	7 — { 6.80	7 — { 7.80	3.20	(2.80)	7 — { 1.00	(÷ 0.40)
		14 — { 7.60	14 — { 8.40	—	—	14 — { 0.80	—
fo-aq., 5°	6.08	—	—	—	—	—	—
fo-aq-prot., 5° .	—	7 — { 4.86	7 — { 5.52	1.96	1.96	7 — { 0.66	0.00
		14 — { 6.02	14 — { 6.28	—	—	14 — { 0.26	—
fo-lact., 5°	5.36	—	—	—	—	—	—
fo-lact-prot., 5°	—	7 — { 4.86	7 — { 5.60	2.00	2.12	7 — { 0.74	0.12
		14 — { 5.92	14 — { 6.52	—	—	14 — { 0.60	—

Ces essais indiquent que cet échantillon d'orge contient de la pep-
tase en petite quantité, mais pas de tryptase active tous les essais,
même à 5°, ayant donné des effets peptonisants sensibles. Le fait que
l'extrait acidulé d'acide lactique à 35° a fait voir un effet plus pro-
noncé que les autres et qu'on y trouve aussi un effet trypsique faible,
semblerait bien indiquer l'existence de substances zymogènes tant pour
l'enzyme trypsique que pour l'enzyme pepsique. Pourtant les traits en
sont si petits que je n'en tirerai pas de conclusions plus étendues.
Mais il n'y a pas moyen de douter qu'en général il n'y ait eu des en-
zymes protéolytiques aux extraits, et surtout aux extraits acidulés
d'acide lactique. Pour s'en convaincre, on n'a qu'à comparer ce qu'on
vient de dire aux changements qu'ont subis les extraits abandonnés à
eux-mêmes du 7 au 14 novembre, changements qui tous indiquent un
dédoublement pepsique. Au contraire, pendant ce temps, aucune aug-
mentation du pouvoir fermentatif ne s'est faite, mais plutôt une diminu-
tion. En d'autres mots: il n'y a pas eu de transformation ultérieure de
proenzymes en enzymes actives.

CONCLUSIONS.

Voici, en résumé, les résultats les plus importants de ces recherches :

I. Un extrait aqueux d'orge en germination (de malt vert) possède des propriétés protéolytiques bien prononcées qui pourront se faire connaître, outre par une autodigestion, par le dédoublement de matières albuminoïdes étrangères ajoutées. Un tel dédoublement, comme par exemple celui de la protéine de froment, peut aller quantitativement et qualitativement très loin. Il montre bien la dépendance d'agents extérieurs qui est caractéristique aux actions diastasiques.

II. Au moyen de précipitations par le chlorure stanneux et par l'acide tannique, on peut démontrer deux phases différentes dans la protéolyse de protéine de froment : une phase hydrolytique, formant des albumoses, ou phase pepsique, et une phase aux dédoublements plus profonds, ou trypsique, conduisant à la formation de composés non-protéiques, cristallins.

III. Il faut supposer que les deux phases sont causées par deux enzymes : la peptase et la tryptase, parce qu'elles se comportent différemment vis-à-vis d'agents extérieurs :

1° Les courbes de température des deux actions ne diffèrent pas seulement de forme. Elles ont aussi des points cardinaux différemment situés (le minimum et l'optimum). V. p. 179.

2° Si on arrête la protéolyse au bout de temps différents, l'action total se dessinera de manières différentes : l'action pepsique opère avec rapidité et sera bientôt arrivée à terme, tandis que l'action trypsique, opérant plus lentement, se continue, après la cessation de la première, jusqu'au dédoublement ultérieur de tous les produits de dédoublement pepsiques.

3° L'influence de variations d'un facteur (température, quantité de l'extrait de malt, concentration de la solution de protéine, durée du temps d'essai) dépend de variations simultanées des autres facteurs.

4° A la phase trypsique, la protéolyse paraît ne pas se faire du tout, ou ne se faire que faiblement en milieu neutre. L'addition d'un petit peu d'acide (organique ou minéral) a un effet fortement accélérateur, celle d'un alcali exerce une influence retardatrice sur l'action.

5° L'influence des acides et des alcalis s'explique suivant la théorie de Fernbach et Hubert : ce sont les phosphates primaires et secondaires se trouvant, avec les enzymes, dans l'extrait de malt, qui décident de la marche de la protéolyse, les premiers ayant un effet favorable, les derniers un effet retardateur sur la protéolyse.

6° La phase trypsique de la protéolyse est retardée proportionnellement à la quantité d'alcool ajoutée.

7° Elle est encore retardée en ligne progressive par les antiseptiques suivants: thymol, chloroforme, formol (acide benzoïque, acide salicylique). L'action pepsique paraît moins sensible, en tout cas vis-à-vis du formol. Ni l'action pepsique ni l'action trypsique ne sont sensiblement affaiblies par le toluol, qui, par conséquent, est un bon préservatif du pouvoir fermentatif protéolytique de l'extrait de malt.

IV. La supposition de l'existence de, au moins, deux enzymes protéolytiques est encore supportée par le fait que la précipitation d'un extrait de malt par l'alcool absolu donne une préparation possédant presque exclusivement des propriétés pepsiques, l'influence de l'alcool supprimant le pouvoir trypsique.

V. Parmi les propriétés physiques et chimiques des enzymes il faut signaler:

1° Elles sont presque également solubles dans l'eau, dans l'acide lactique faible et dans la glycérine.

2° Elles ne sont qu'extrêmement peu diffusibles à travers une membrane animale.

3° A l'état sec elles supportent le chauffage lent jusqu'à 95°, pour le moins, tandis qu'en solution elles se détruisent à 70° environ.

4° La congélation d'un extrait de malt n'en détruit pas le pouvoir trypsique. Il faut supposer qu'il en est de même du pouvoir pepsique.

5° La lumière n'a qu'une influence retardatrice minime, si elle en a une, sur la peptase et sur la tryptase.

6° Au contraire, elles sont très sensibles, l'une et l'autre, et surtout la tryptase, à l'influence d'acides et d'alcalis forts, et à celle de plusieurs antiseptiques ordinaires.

7° Abandonnées à elles-mêmes, à une température basse, les enzymes pepsique et trypsique, additionnées de toluol, se conservent assez longtemps. Ceci est le cas surtout pour l'enzyme pepsique.

VI. Les enzymes protéolytiques de l'extrait de malt sont à même de dédoubler des matières protéiques très diverses, tant d'origine végétale que d'origine animale. En voici que dédouble la tryptase en ligne progressive dans l'ordre cité: protéine de malt, protéine de seigle, protéine d'orge, caséine, protéine d'avoine, protéine de froment, légumine. La peptase et la tryptase n'exercent, au contraire, qu'une influence faible sur l'ovalbumine, tandis qu'elles transforment énergiquement la fibrine de bœuf (réaction de tryptophane). A plusieurs égards le dédoublement protéolytique par les enzymes pro-

téolytiques de l'extrait de malt ne le cède ni quantitativement ni qualitativement à celui qu'opèrent la pepsine et la trypsine animales.

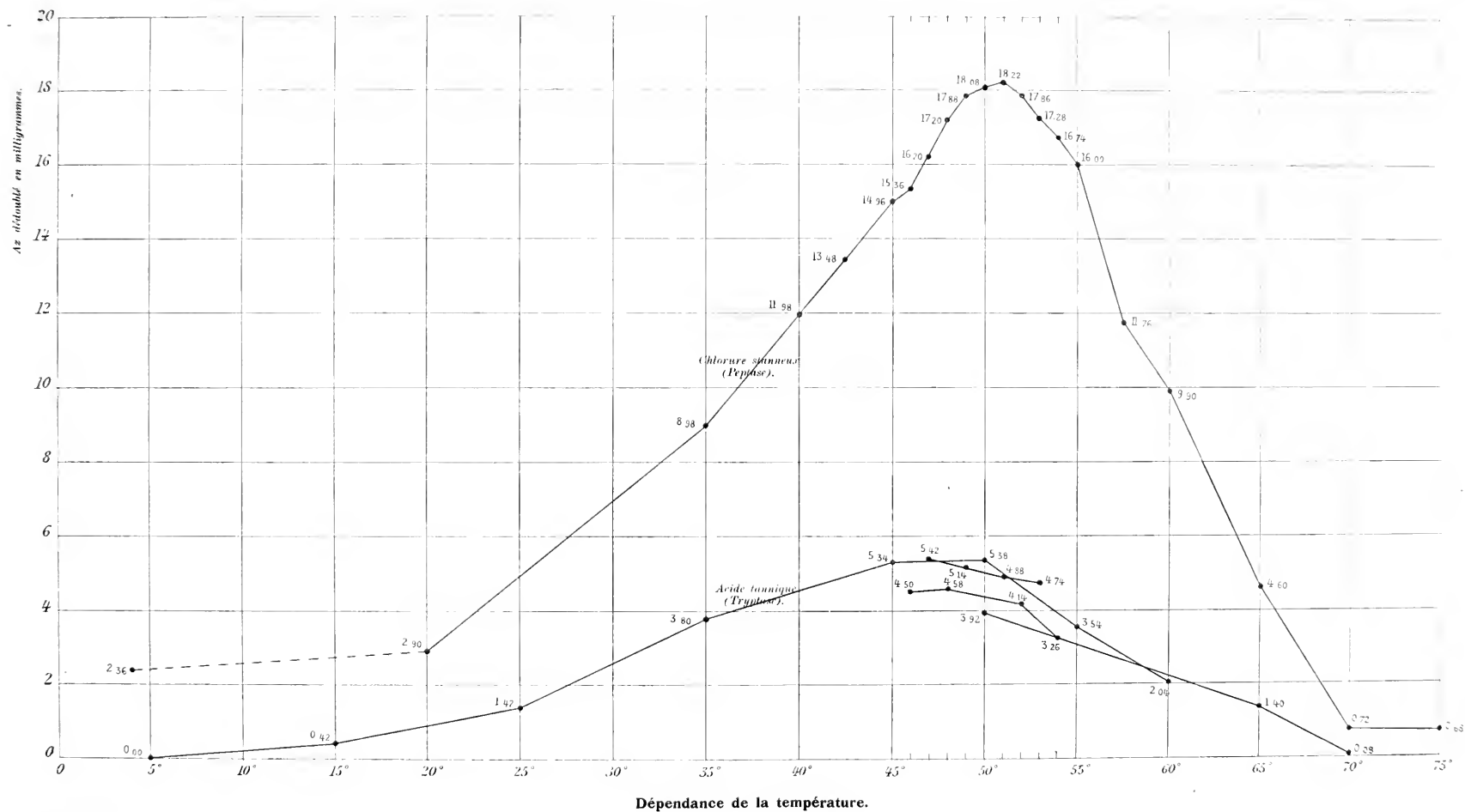
VII. La peptase forme rapidement des produits de dédoublement protéolytiques de la protéine de froment un grand nombre d'albumoses dont la tryptase continue le dédoublement formant peu à peu des composés non protéiques, cristallins. Les vraies peptones ne se montrent qu'en très petit nombre servant, probablement, d'intermédiaires entre les albumoses et les produits cristallins. Ces transformations se manifestent par l'augmentation rapide de composés azotés diffusibles et par la formation de substances qui se soustraient à la précipitation par l'acide tannique, par l'acétate uranique et par l'acide phosphotungstique (corps amidés, bases hexoniques, etc.). Parmi les produits de dédoublement, on trouve de l'ammoniaque en abondance.

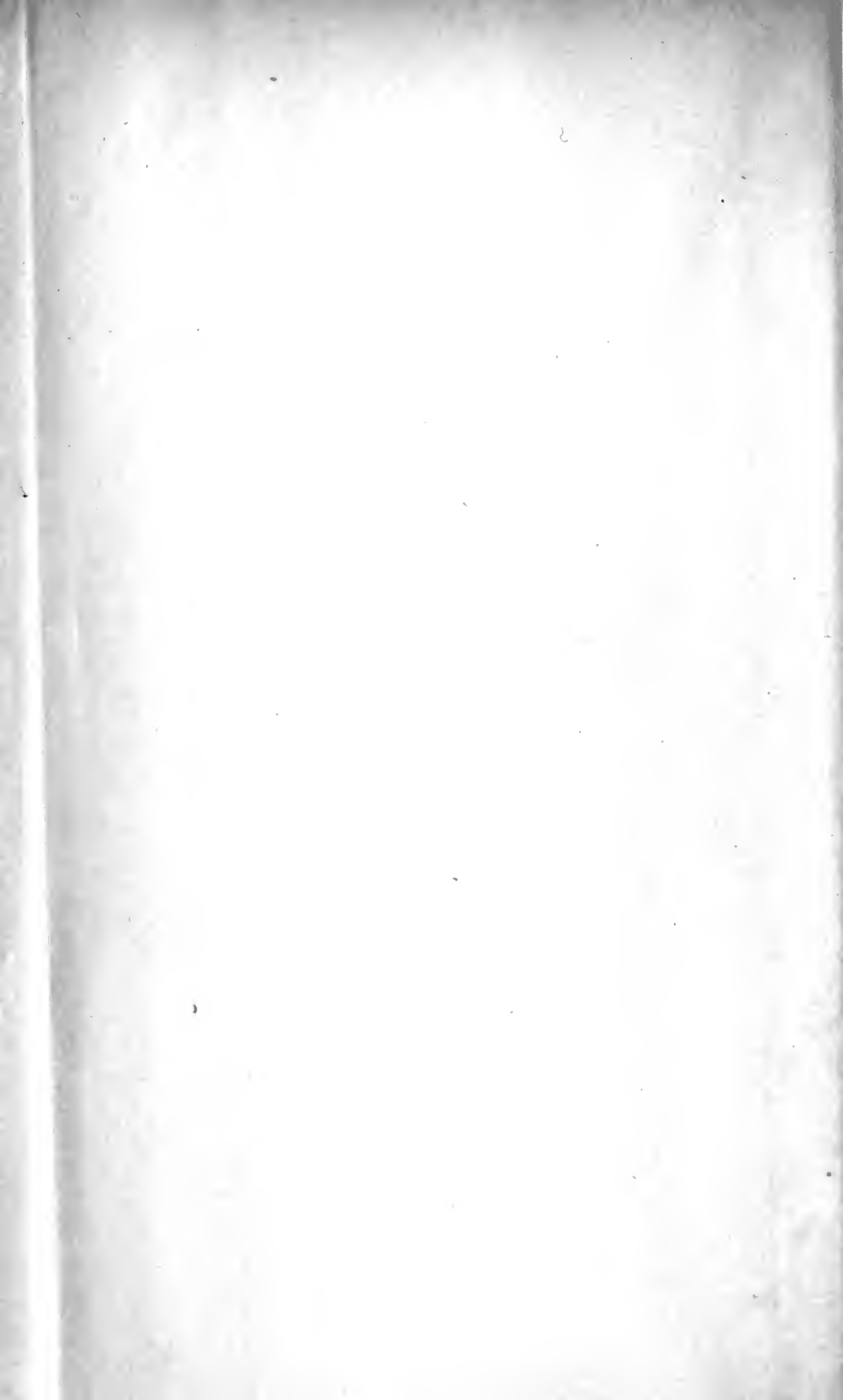
VIII. Dans le grain d'orge non germé je n'ai pu démontrer qu'un pouvoir fermentatif pepsique extrêmement faible, et point de pouvoir fermentatif tryptique. Je n'ai pas non plus pu démontrer l'existence de celui-ci pendant 3 jours de trempe, ni pendant les 3 jours de germination suivants. Mais au quatrième jour de germination, il a paru tout d'un coup avec grande force, atteignant son maximum déjà au sixième jour de germination. Dès lors, il s'est maintenu presque constant jusqu'au treizième jour de germination, c'est à dire tant qu'on en a suivi la marche.

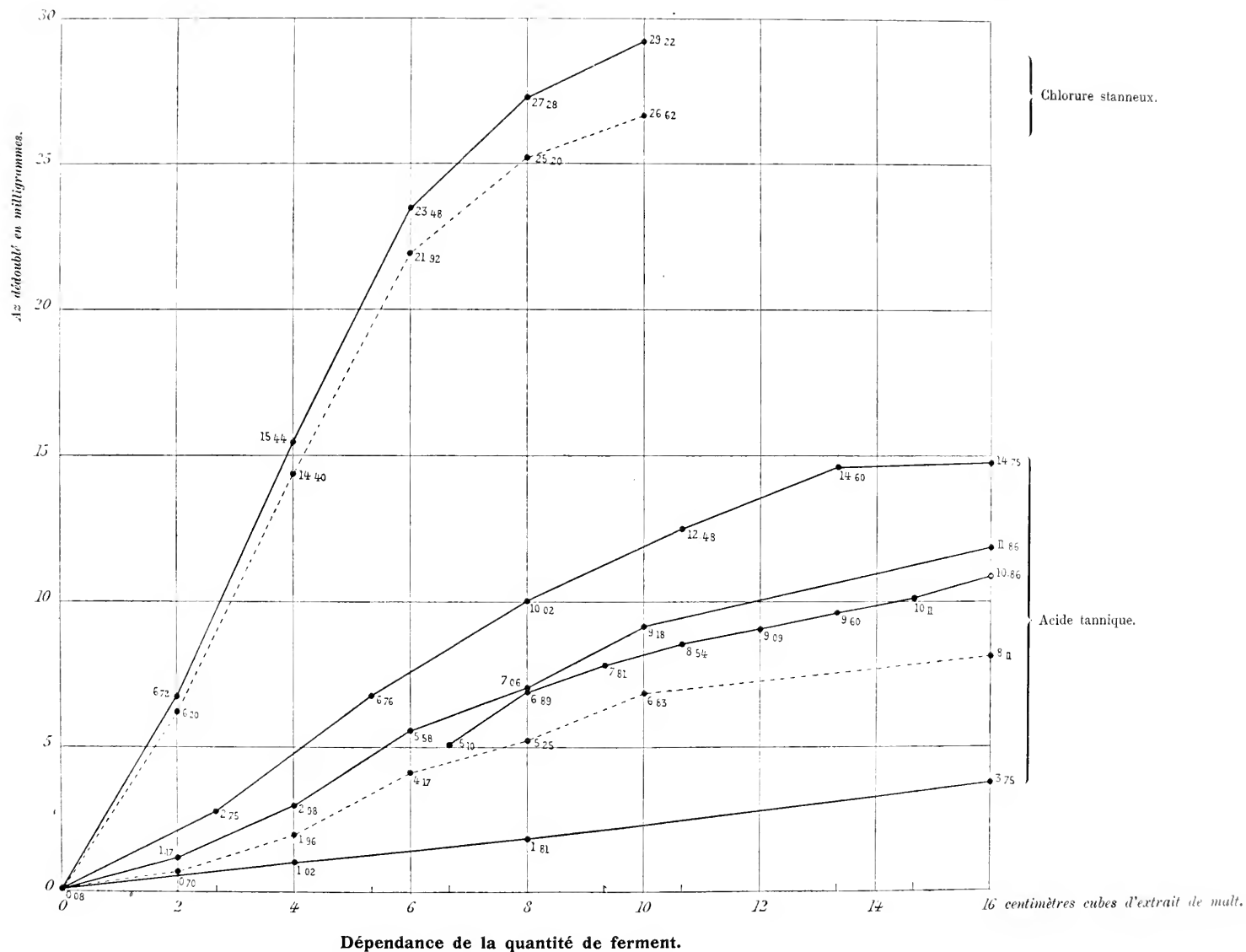
IX. Il paraît qu'on peut démontrer, dans le grain d'orge non germé, la présence de petites quantités de proenzymes tant pour la peptase que pour la tryptase. On peut les rendre actives par l'action d'acide lactique faible et d'une température convenable.

(Voir aussi les Pls. I—XVII).

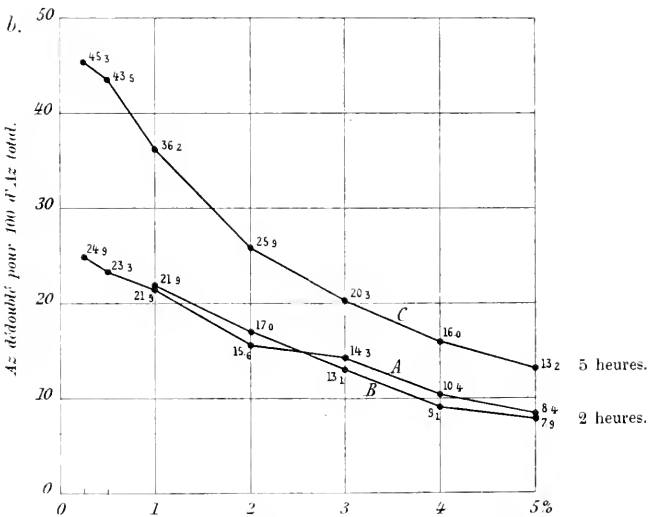
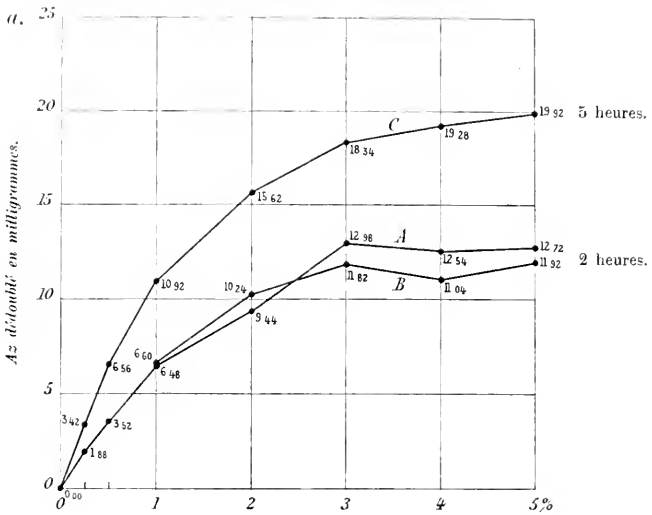
7/6



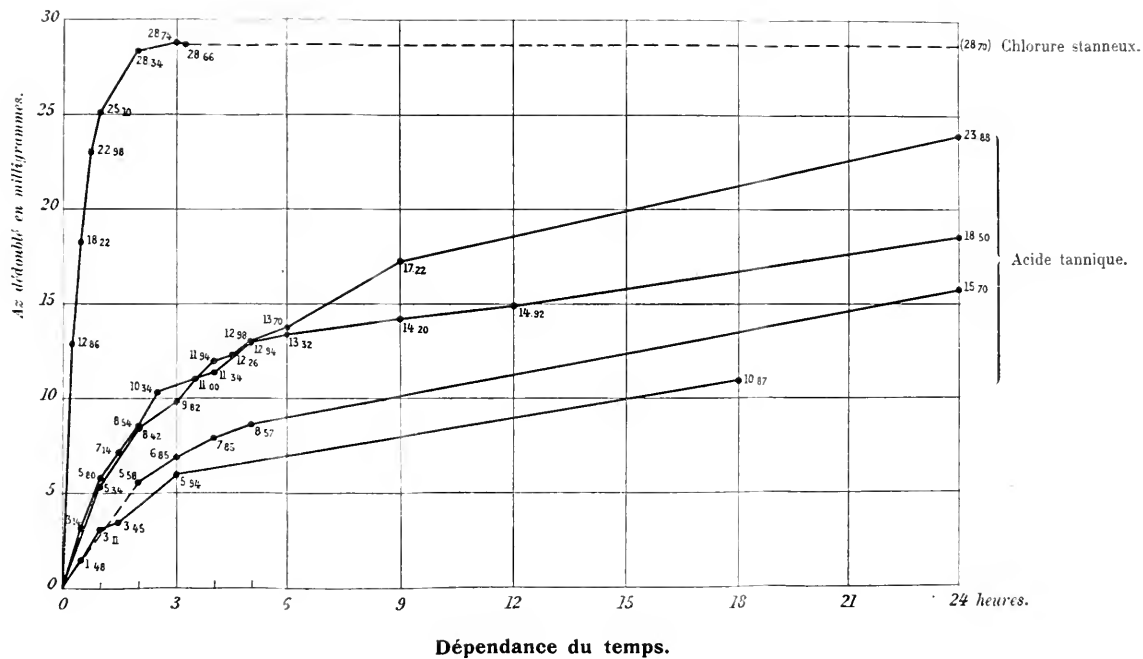




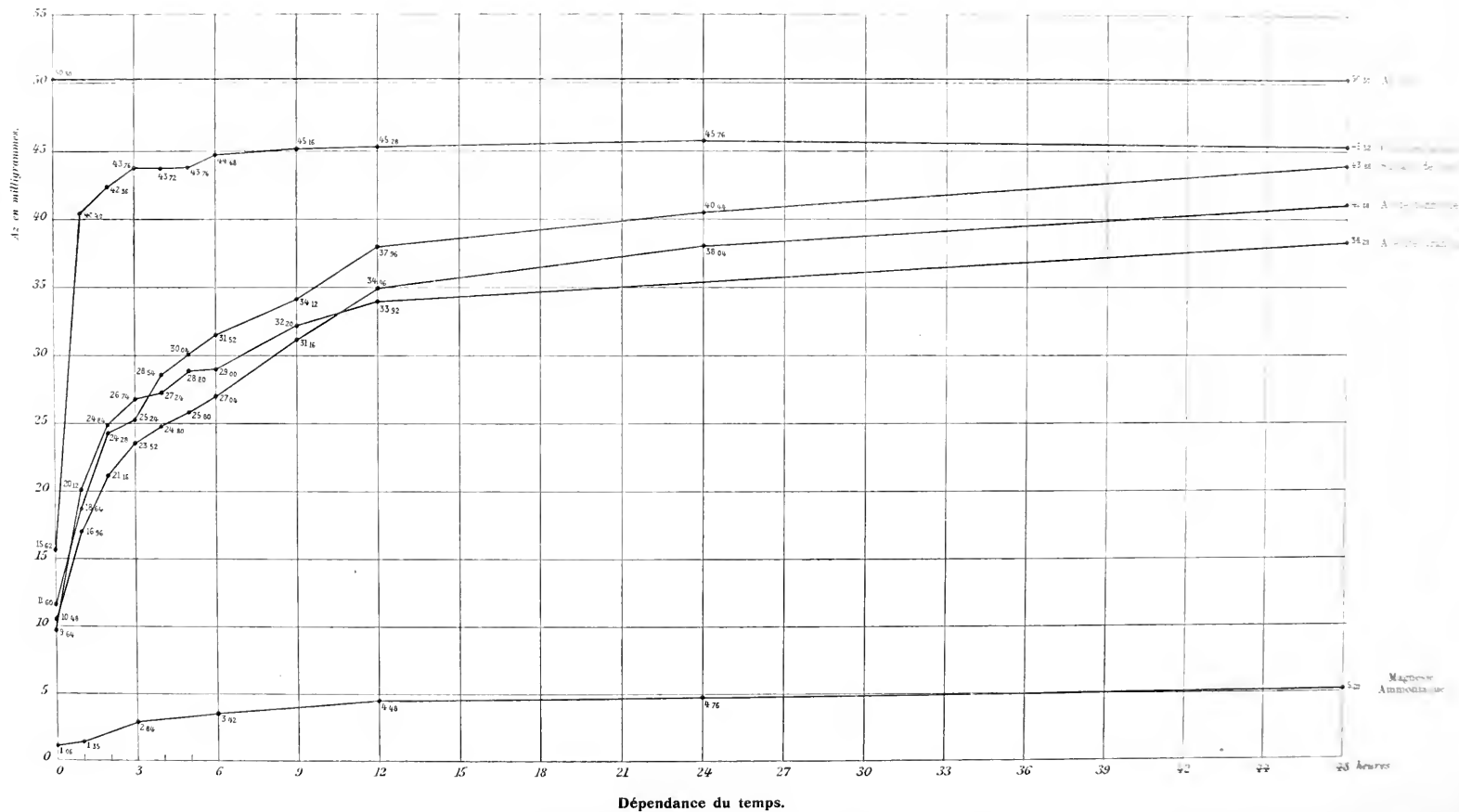




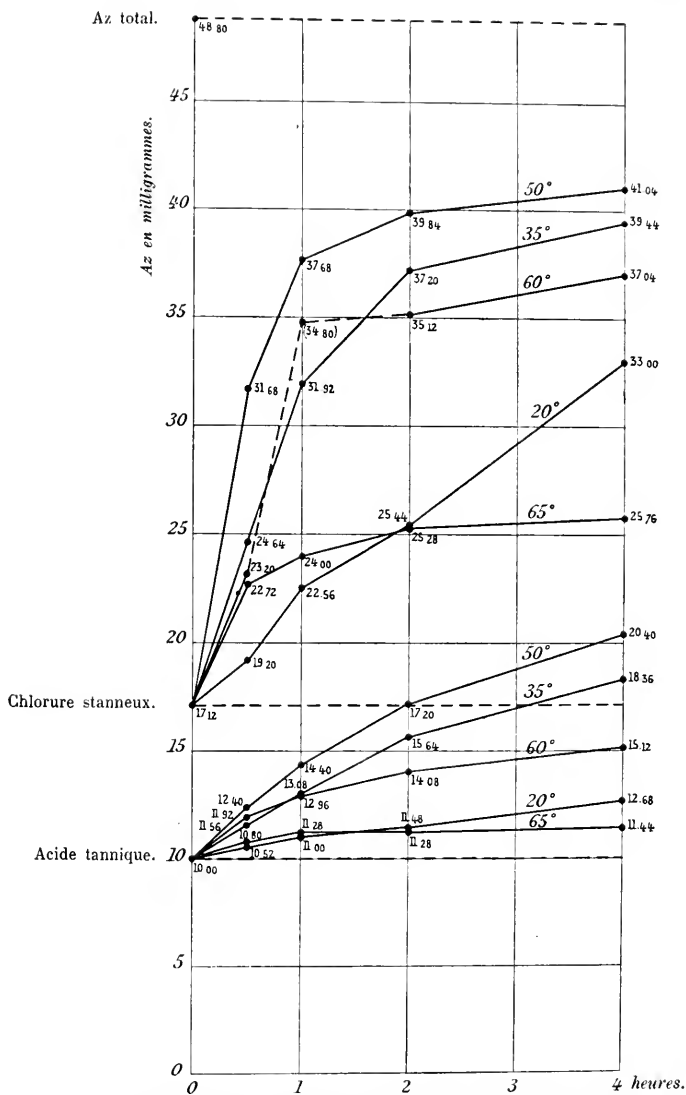
Dépendance de la concentration de la solution de protéine.





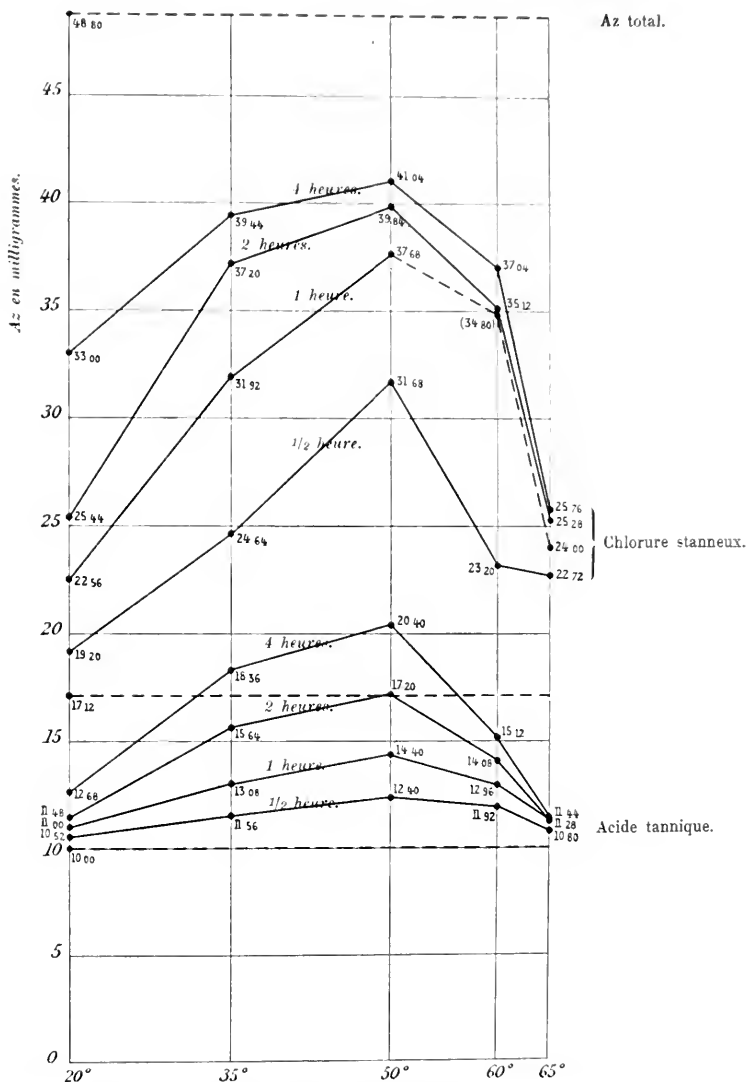






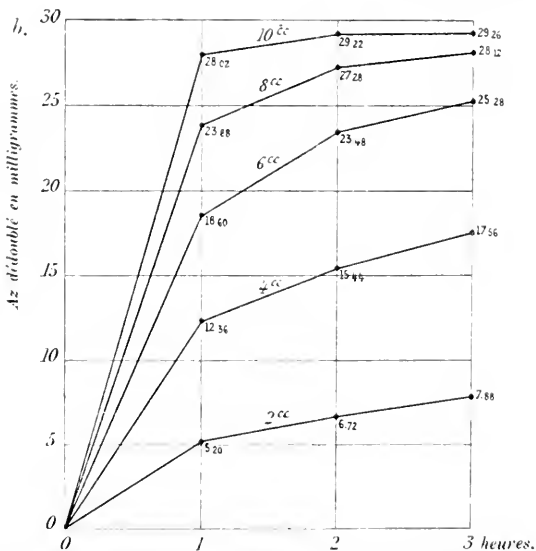
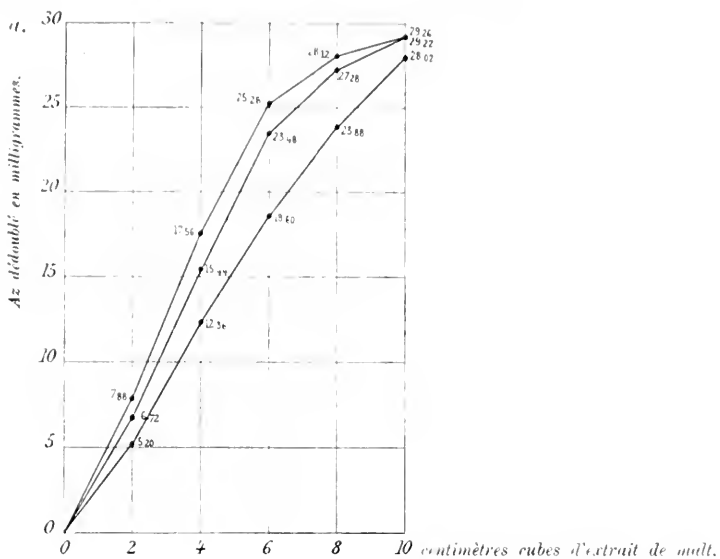
Dépendance du temps à des températures différentes.





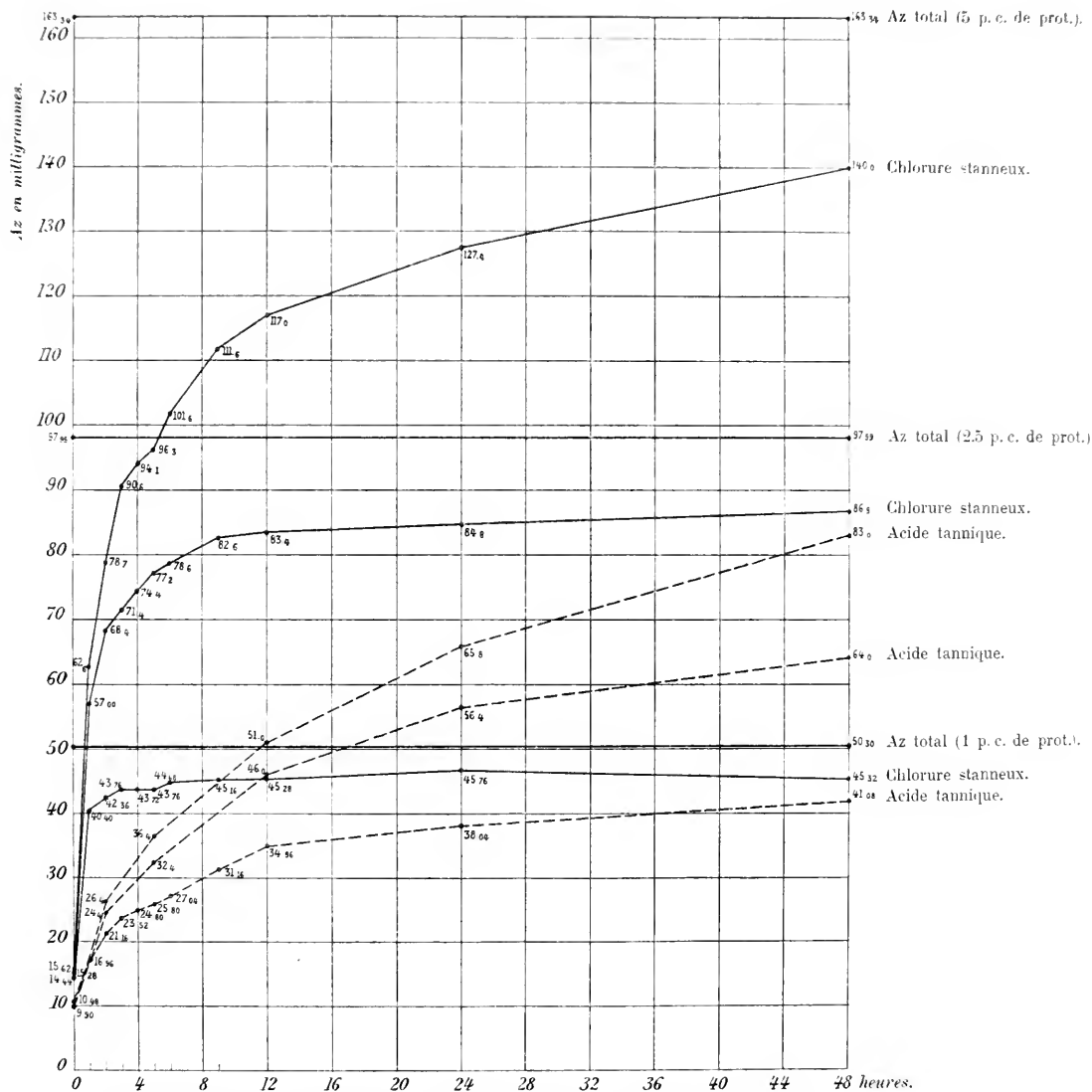
Dépendance du temps à des températures différentes.





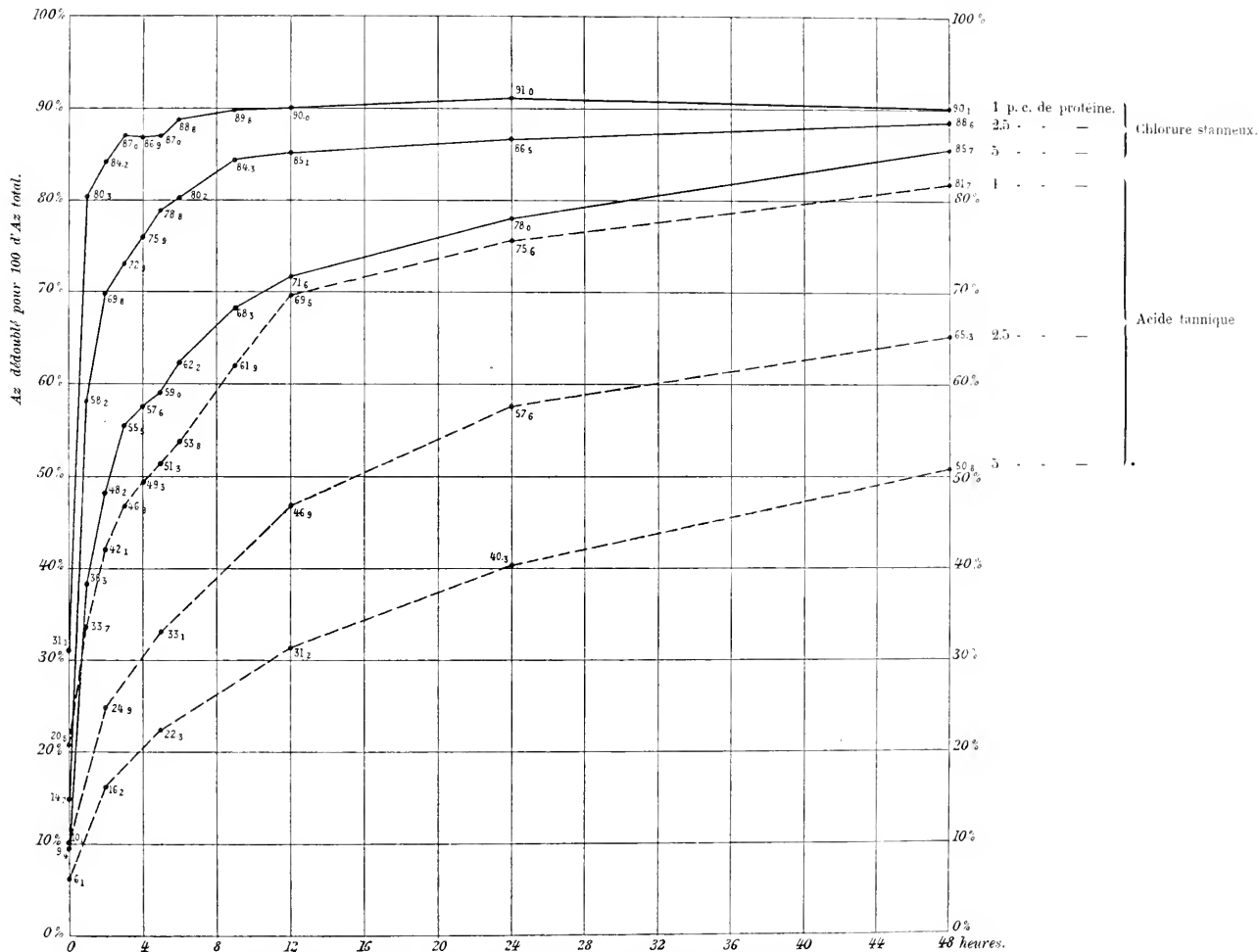
Dépendance du temps à des quantités de ferment différentes.





Dépendance du temps à des concentrations de protéine différentes.

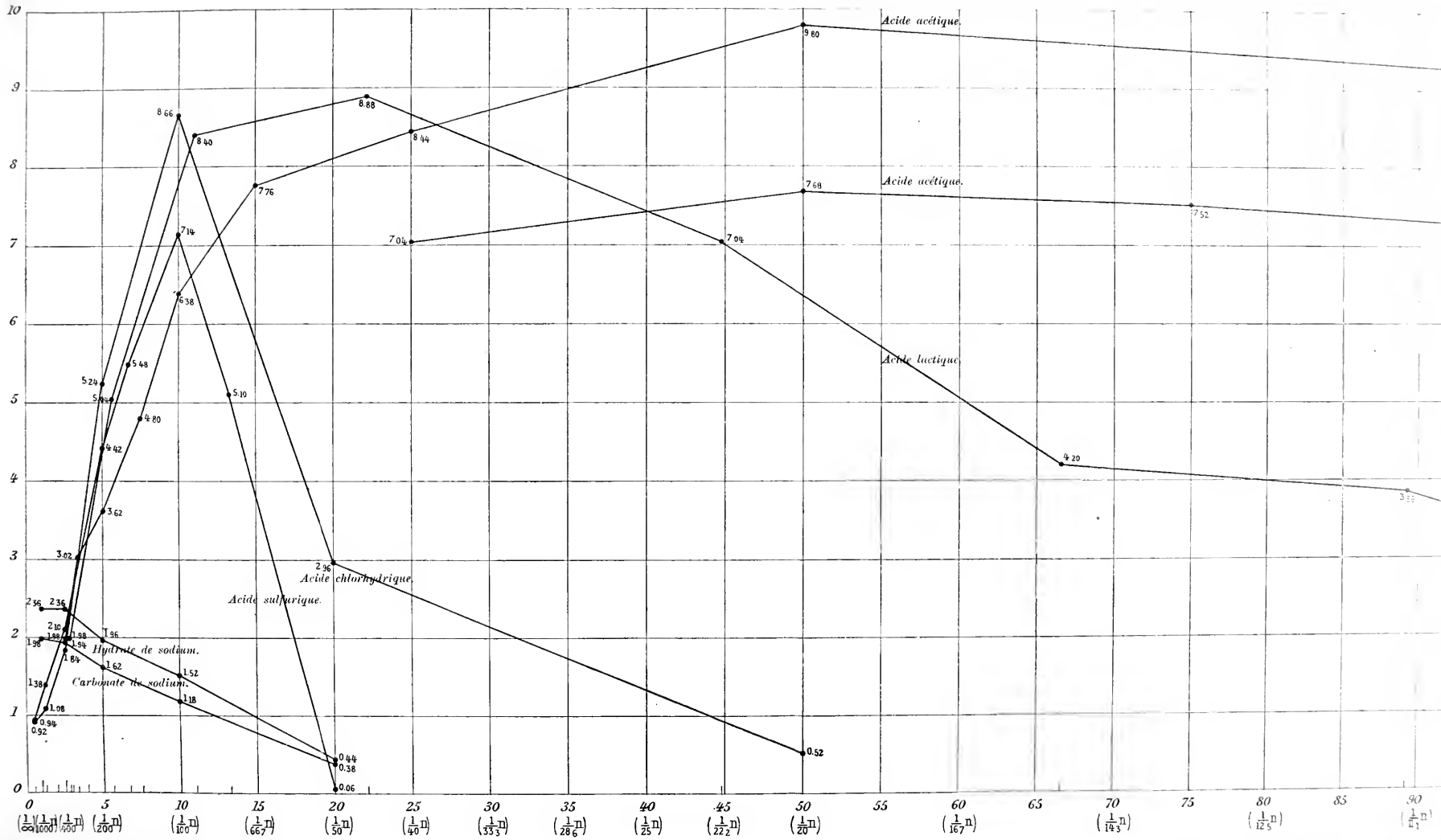




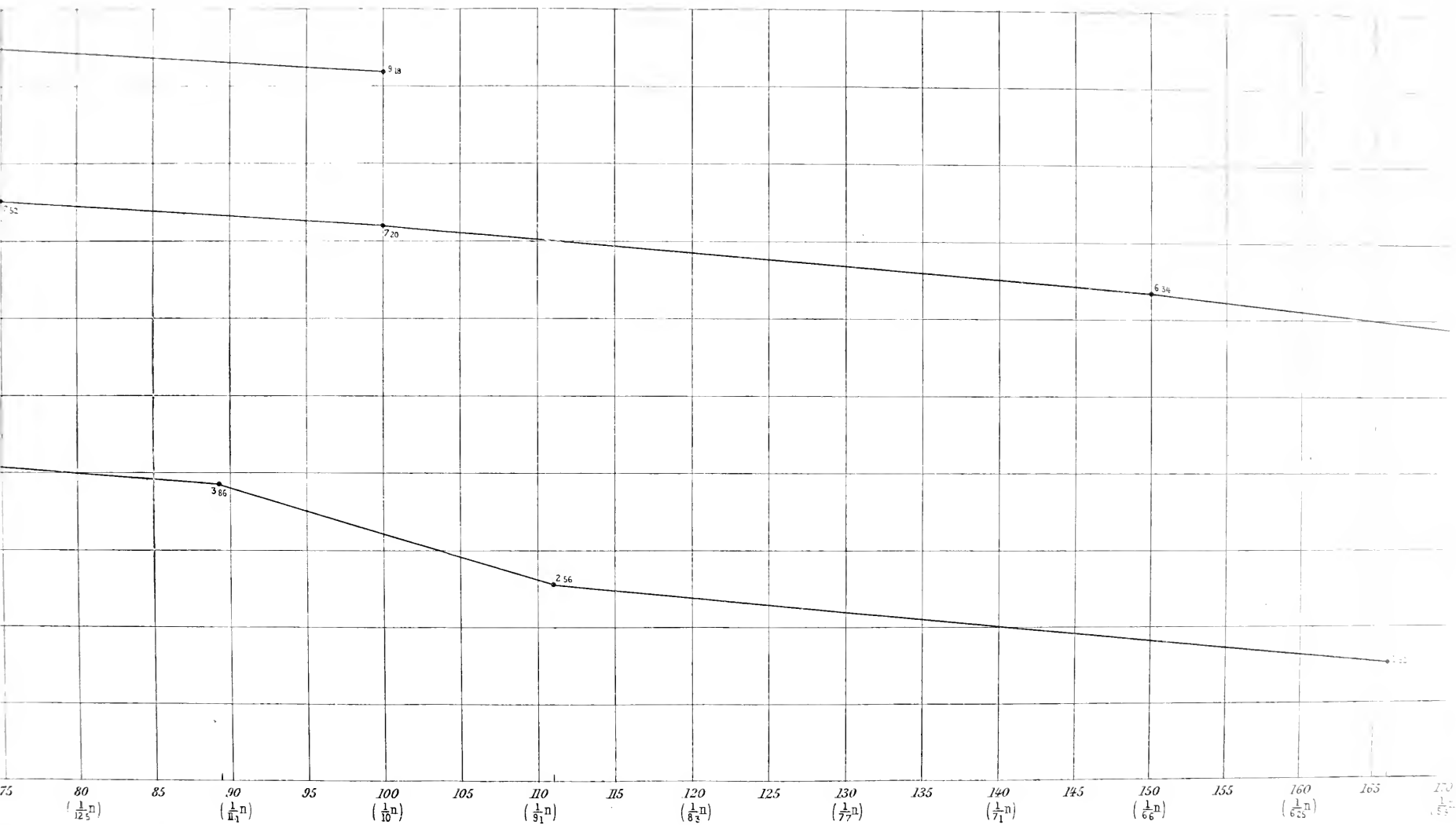
Dépendance du temps à des concentrations de protéine différentes.

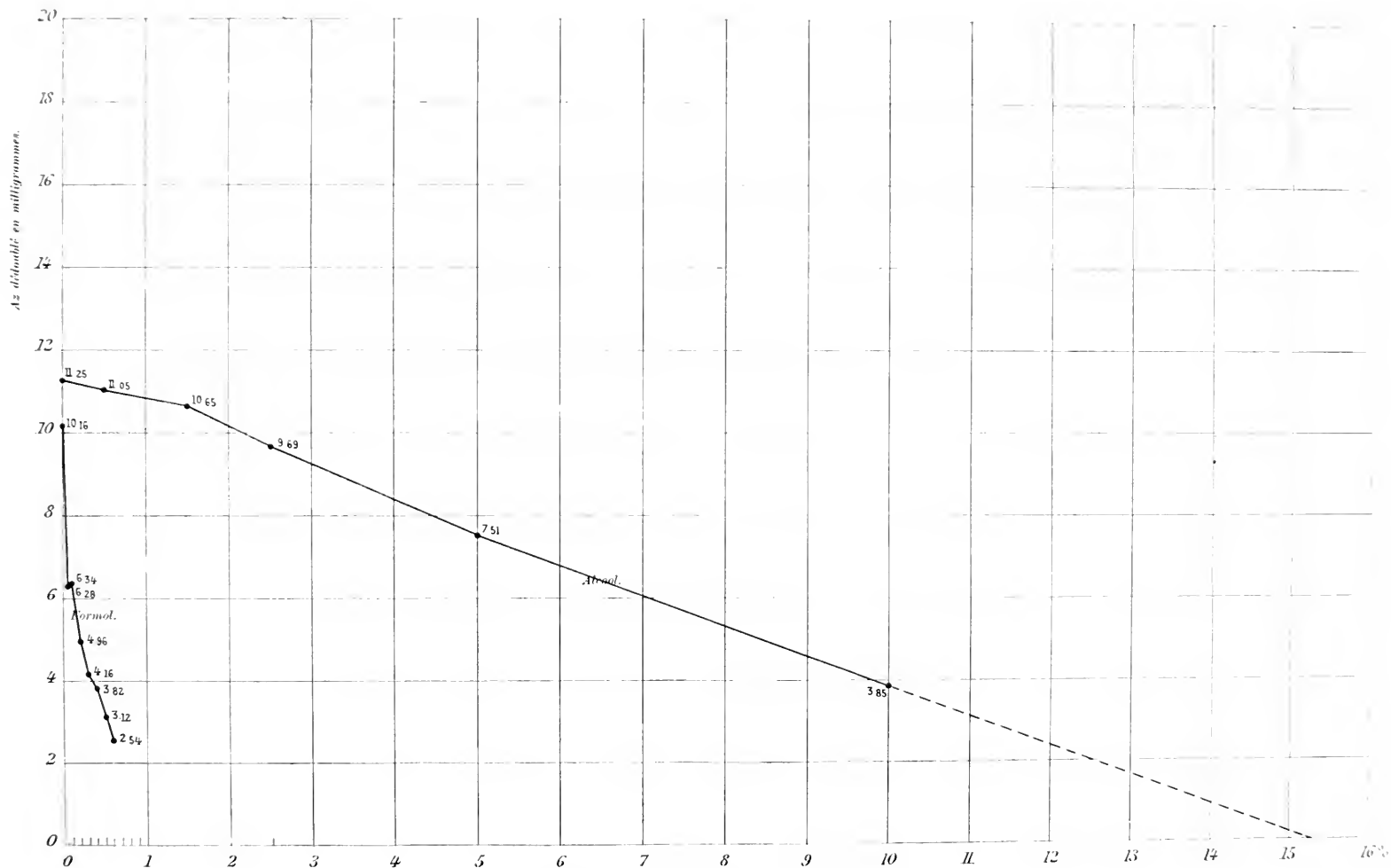


Az dédoublé en milligrammes.



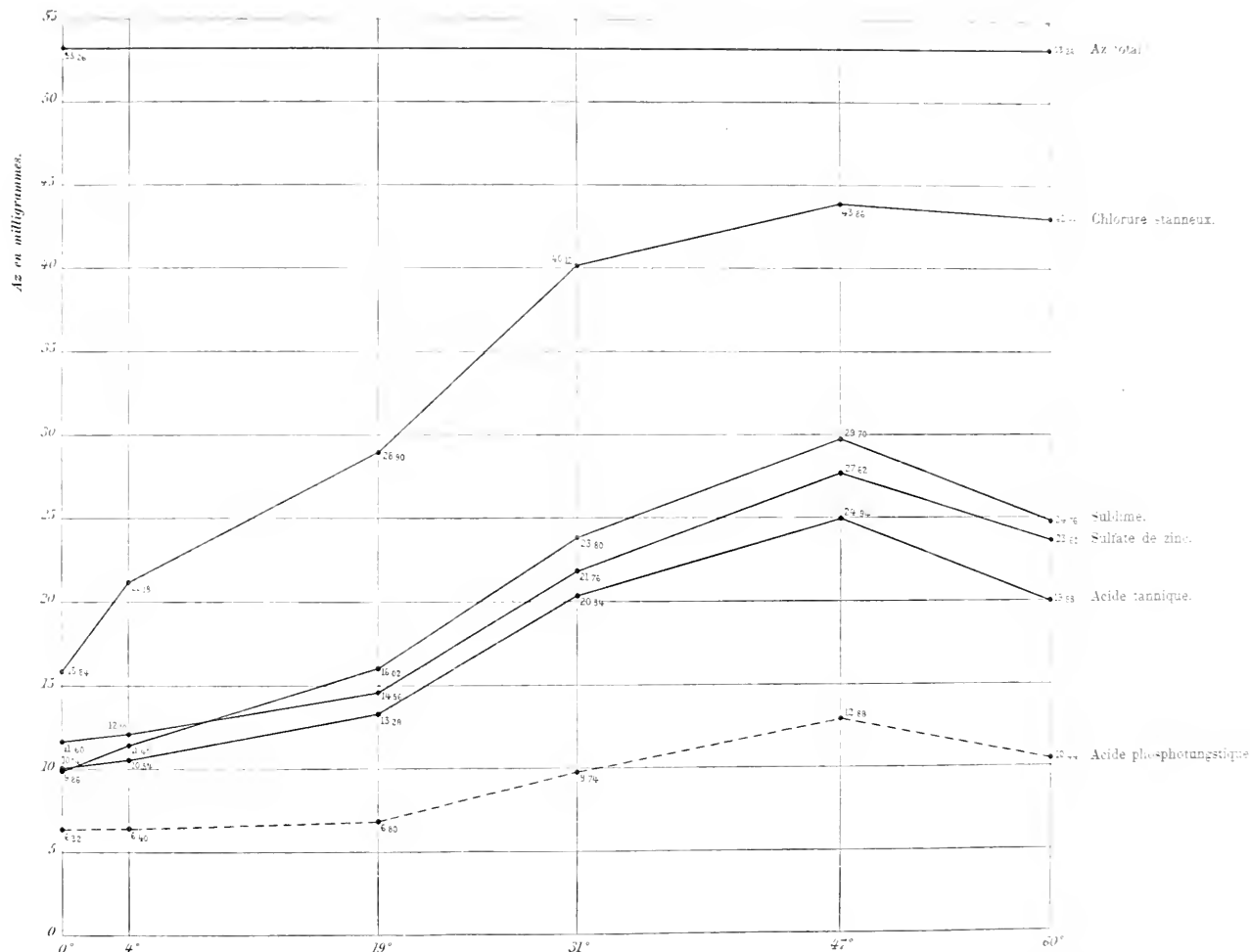
n = solution titrée normale.





Influence d'alcool et de formol sur la tryptase.

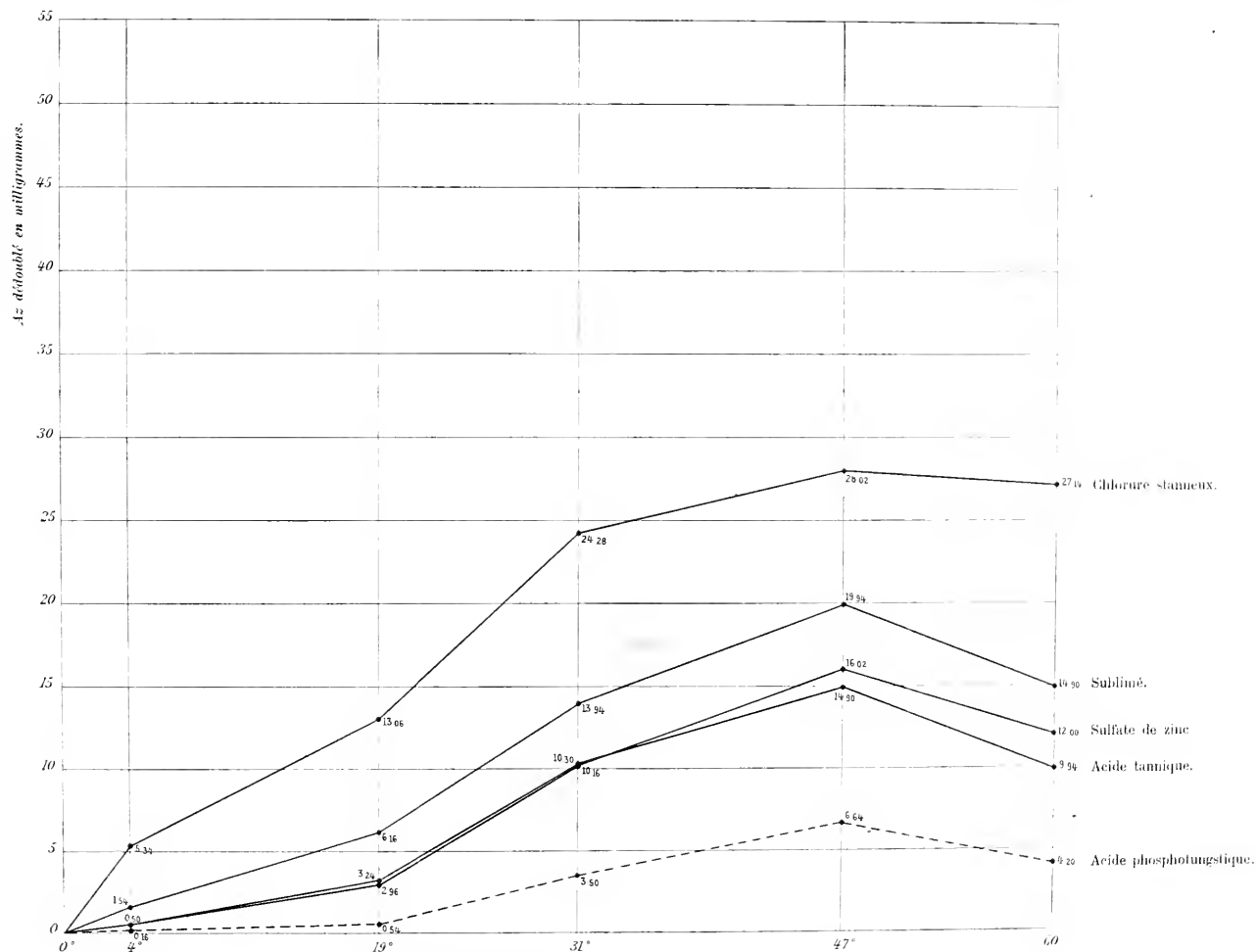




Produits de dédoublement protéolytiques.

(Précipitations au bout de 3 heures à des températures différentes.)

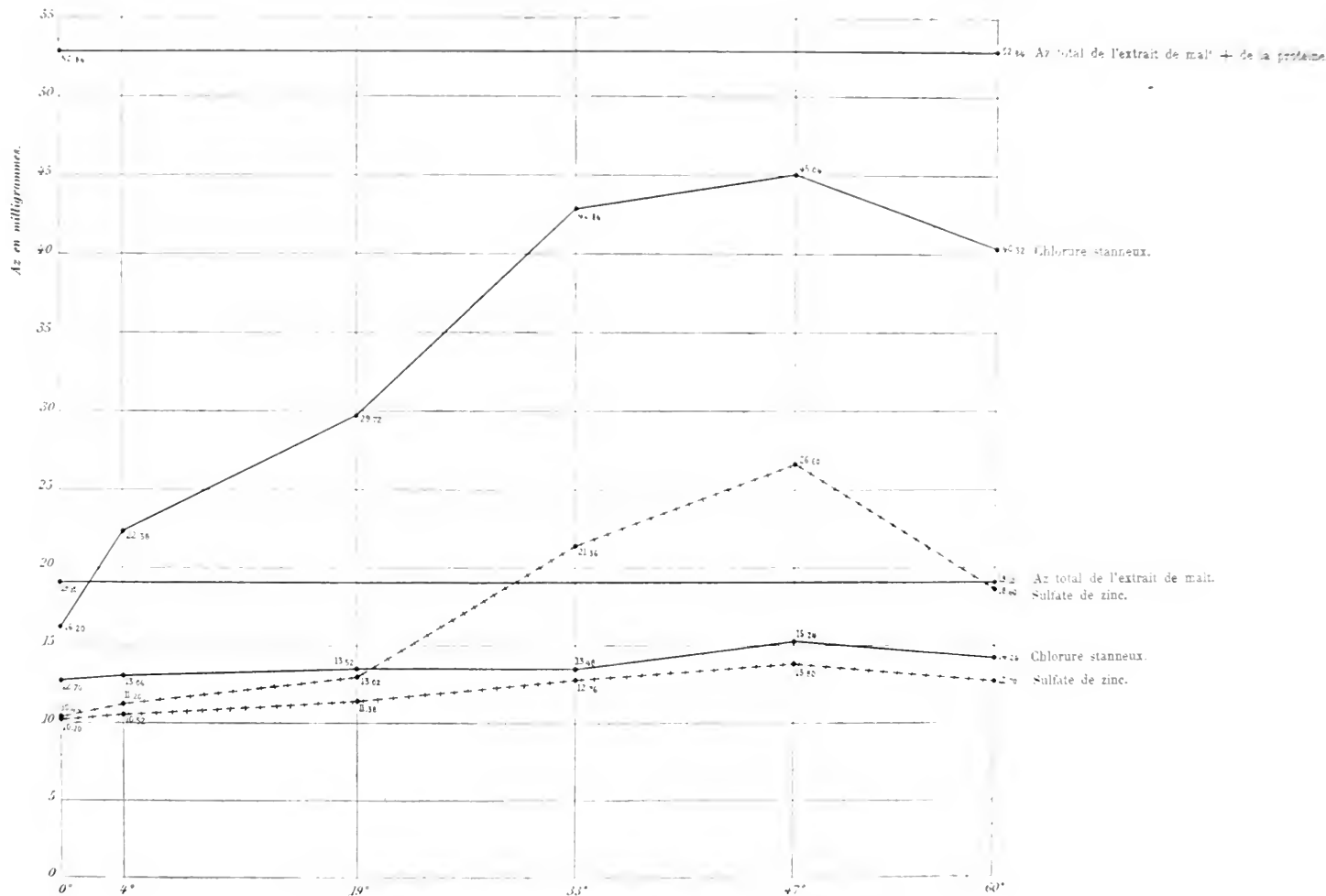




Produits de dédoublement protéolytiques.

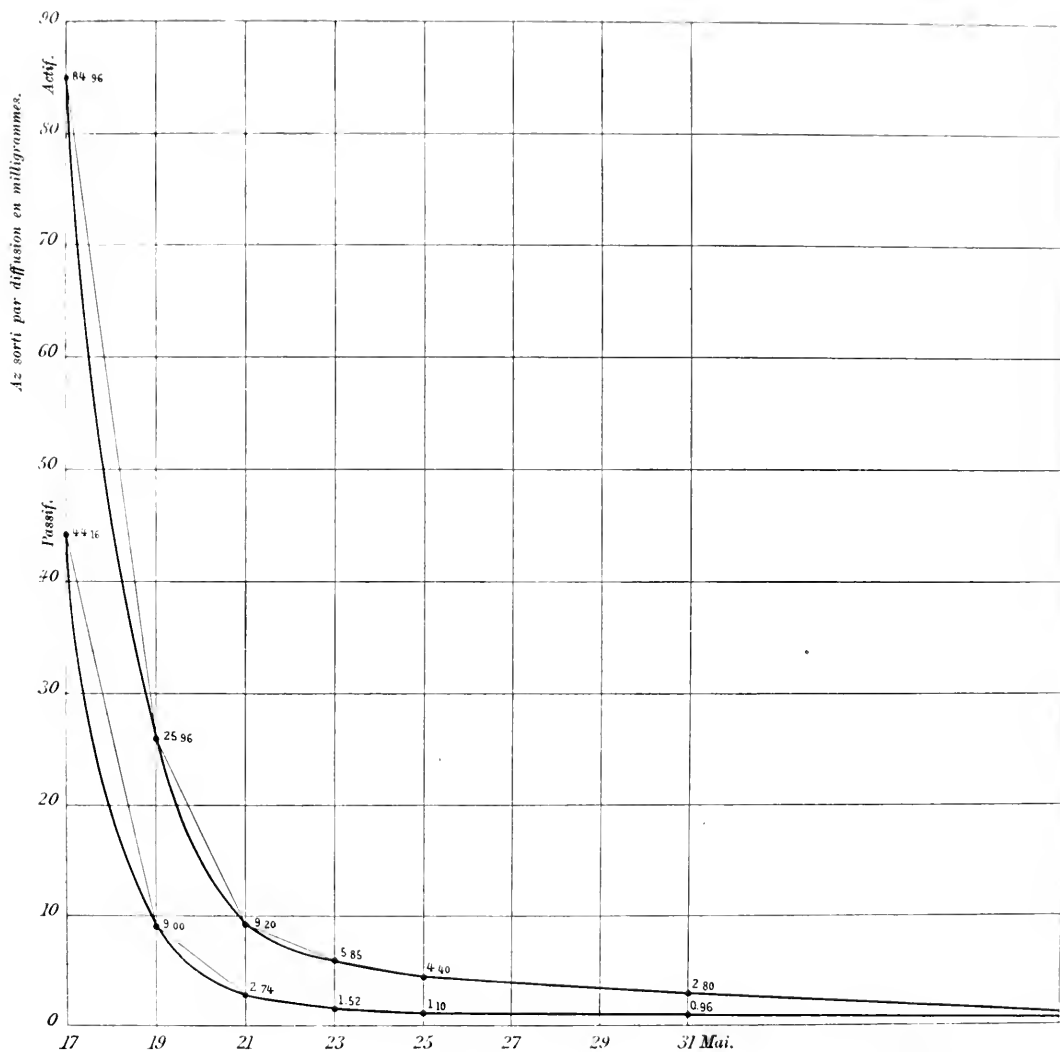
(Précipitations au bout de 3 heures à des températures différentes.)





Produits de dédoublement protéolytiques.
(Précipitations au bout de 3 heures à des températures différentes.)





Courbes de diffusion.



4

1

MEDDELELSER

FRA

CARLSBERG LABORATORIET.

UDGIVNE

VED

LABORATORIETS BESTYRELSE.

EXTRA HEFTE.

KJØBENHAVN.

I KOMMISSION HOS H. HAGERUP.

THIELES BOGTRYKKERI.

1901.

Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet

udgaa i tvangfrie Hefter. Naar der er udkommet saa mange Hefter, at deraf passende kan dannes et Bind, vil der blive leveret særskilt Titelblad og Indholdsliste med Angivelse af den Aarrække, som Bindet omfatter.

Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

NB. Ved Indbindingen af 5. Bind betragtes Extraheftet som Bindets sidste.

11





CARLSBERG LABORATORIET

1876—1901.

11/1

CARLSBERG LABORATORIET

1876—1901.

Allerede 1871 fandtes paa Gamle Carlsberg et lille Bryggerilaboratorium, og til at forestaa dette havde J. C. Jacobsen 1. Mai 1875 antaget Cand. polyt. J. Kjeldahl, som dengang var Assistent hos Professor C. T. Barfoed paa Landbohøjskolens kemiske Laboratorium, og samtidig giver ham Udsigt til en Forstanderplads ved et nyt stort kemisk-fysiologisk Laboratorium for zymotekniske Undersøgelser, som han i en nær Fremtid agtede at oprette. I Virkeligheden begyndte Jacobsen endnu i Efteraaret 1875 Bygningsarbejder til Indretningen af dette Carlsberg Laboratorium, hvis Montering saa Kjeldahl ledede, saa at den kemiske Afdeling allerede kunde tages i Brug i Sommeren 1876. Men den fysiologiske Afdeling var da endnu ganske i sin Vorden, og Ordningen og Indretningen af denne overdroges til Cand. med., nuværende Professor i Plantefysiologi ved Universitetet, R. Pedersen, som blev ansat ved Laboratoriet 1. Juli 1876. Nu havde Jacobsens Planer dog antaget langt større Dimensioner. Nu skulde Carlsberg Laboratoriet kun være en enkelt Afdeling af Carlsberg Fondet, en Stiftelse til videnskabelige Formaals Fremme, som Jacobsen oprettede 25. Sept. 1876, og som han med højhjertet og usædvanlig Rundhaandethed udstyrede med rigelige Midler ved en Række af Gavebreve¹. Af dette Carlsberg Fond blev Laboratoriet *Afdeling A*. Dets Opgave har Jacobsen selv udførlig angivet i Fondets Statuter § viii². I faa Ord kan den siges at være den, at skabe »et muligt fuldstændigt videnskabeligt Grundlag for Maltnings-, Brygnings- og Gjærings-Operationerne«. Formaalet for

¹ Se *Aktstykker vedrørende Carlsbergfondet*. Kjobenhavn 1894. S. 1, 4, 35, 47, 64. Sml. ogsaa nedenfor S. 16 og 17.

² Statutterne findes aftrykte i *C. L. Medd.* 1, x—xvj.

Afdeling B var at støtte videnskabelige Formaal i Almindelighed, dog med en i Statutterne nærmere angivet Begrænsning, og hertil knyttede Jacobsen allerede Aaret efter som *Afdeling C* det nationalhistoriske Museum paa Frederiksborg, der dog har sin egen Bestyrelse. Hele Stiftelsen blev stillet under det kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Protektorat. Dens Direktion skulde bestaa af 5 Mænd, hvoraf 3 naturkyndige, og vælges af Videnskabernes Selskab ud af dets egen Midte. Laboratoriets særegne Bestyrelse skulde bestaa af de 3 naturkyndige Medlemmer af Fondets Direktion i Forbindelse med een eller to Tilforordnede, der enten som Bryggerikyndige eller af andre Grunde maatte antages at hāve Kjendskab til og Interesse for Laboratoriets Opgaver.

Bestyrelsen holdt sit første Møde 30. Nov. 1876. Den bestod af de 3 naturkyndige Medlemmer af Fondets Direktion, Lektor i Kemi ved Landbohøjskolen, Professor C. T. Barfoed, Professor i Fysiologi ved Universitetet P. Panum og Professor i Zoologi ved Universitetet Jap. Steenstrup, og de Tilforordnede vare Jacobsen selv og hans mangeaarige Medarbejder i Bryggeriet Erh. Kogsbølle. Efter at have konstitueret sig valgte den Barfoed til Formand, en Stilling, han indtog til sin Død, og som han udfyldte med overlegen Dygtighed og Takt og med den mest levende Interesse, ligesom han ved sin ualmindelige Administrationsevne og store Sands for Orden og Punktlighed paatrykte hele den nye Institution sit Præg. I de 25 Aar, Carlsberg Laboratoriet har bestaaet, er Bestyrelsen stadig bleven gjenvalgt af Videnskabernes Selskab, og Forandringer i dens Sammensætning ere kun skete ved Dødsfald. Istedensfor Panum, som døde 2. Maj 1885, valgtes Lektor, nuværende Professor i Kemi ved Universitetet, S. M. Jørgensen; istedenfor Jacobsen, som døde 30. April 1887, valgtes Bryggeriet Gamle Carlsbergs Direktør, Kaptejn S. A. v. d. Aa Kühle; istedenfor Barfoed, som døde 30. April 1889, valgtes Professor i Botanik ved Universitetet E. Warming, og istedenfor Steenstrup, som døde 20. Juni 1897, valgtes Professor i Fysik ved Universitetet C. Christiansen. Kogsbølle er saaledes den Eneste, som har været Medlem af Bestyrelsen i alle de forløbne 25 Aar. Formandspladsen overdroges efter Barfoeds Død til S. M. Jørgensen.

Det ældre Laboratorium.

Dette var indrettet i en ældre, frit liggende Bygning paa Sydsiden af Bryggeriets indre Gaard. Bygningens hele Grundflade var omtr. 4700 Kvadratfod (470 Kvadratmeter), og deraf var omtr. 2800 Kvadratfod (280 Kvadratmeter) indvendig ombygget til den Række Lokaler, som i den vedføjede Grundplan (Pl. I) ere betegnede ved A, B, C, D, E, F, G, H, I og K, medens L og L' ligesom M vel forbeholdtes til senere Udvidelse af Laboratoriet, navnlig til Arbejdslokaler for Assistenten, men dog foreløbig ligesom tidligere skulde benyttes af Bryggeriet.

Laboratoriet havde to Afdelinger, en kemisk og en fysiologisk. De laa hver for sig, men stod af Hensyn til den Samvirken, som ofte maatte finde Sted imellem dem, i let Forbindelse med hinanden. Lokalerne vare fordelte og indrettede paa følgende Maade:

A. Forstue.

B. Fysiologisk Laboratorium til Forsøg i Mørke m. m.

1. Thermostatisk Apparat med flere Afdelinger. — 2. Vandluftpumpe. — 3. Lufttrykpumpe.

C. Fysiologisk Laboratorium til mikroskopiske Arbejder m. m.

4. Vindkjedel, i Forbindelse med Lufttrykpumpe i B og med konstant Vandtryk.

D. Præparatværelse.

5. Skabe.

E. Arbejdsværelse og Vejestue.

6. Stenbord til Vægte.

F. Kemisk Laboratorium til analytiske Arbejder.

7. Arbejdsskab med Dampapparat, Sandbad osv. — 8. Arbejdsskab til Afdampninger osv. — 9. Stenbord til Elementæranalyse osv. — 10. Vandblæseapparat. — 11. Vandluftpumpe. — 12. 12. Tørreskabe. — 13. Gasometer med Opstilling til Afløb for Vand.

G. Kemisk Laboratorium til større Arbejder.

14. Faste Ovne til Smeltninger osv. — 15. Kvægsølvluftpumpe (efter Ludwig). — 16. Svaleapparat til destilleret Vand, i Forbindelse med Dampkjedlen til 7 i F. — 17. 17. Pasteur'ske Gjæringskar med Dampkar. — 18. 18. Destillerapparat med Opvarmning ved Damp.

H. Kemisk Laboratorium til Arbejder med Svovlbrinte o. desl., tillige Rengjøringslokale.

19. Arbejdsskab med Svovlbrinteapparat.

- I. Rum til Brændsel.
- K. Trapperum med Udgang til Gaarden og Opgang til Laboratoriets Magasin.
- L. og L'. Projekterede Arbejdsværelser for Assistenten.
- M. Rum, som er bestemt til Laboratoriets Udvidelse.

Lokalerne vare 11,5 Fod (3,63 M.) høje og opvarmedes ved Ventilationsovne, som forsynedes med frisk Luft ved Kanaler under Gulvet. Luften udsugedes af Lokalerne gennem Riste i Gulvet til Kanaler i de hule Skillerumsmure (se Tegningen Pl. II), som atter stod i Forbindelse med Appelskorstene, der omgav Skorstensrørene, hvilke sidste vare af Støbejern. Ogsaa ved Ventiler under Loftet kunde Luften fra Lokalerne, og ligeledes fra Arbejdsskabene, udsuges til Appelskorstenene.

Laboratoriet forsynedes med filtreret Vand og med Damp fra Bryggeriet, med Gas fra Frederiksberg Gasværk.

Hvor godt dette ældre Laboratorium var indrettet og udstyret, vil fremgaa deraf, at der fra dets Grundlæggelse i 1875 indtil dets Overgivelse til Carlsbergfondet var anvendt omtr. 15000 Kr. til dets Montering og Forsyning med Instrumenter, Apparater o. desl. Imidlertid fandt Jacobsen dog ikke dets Inventarium fuldt tilfredsstillende og lovede derfor i Bestyrelsens første Møde, at hvad der endnu maatte mangle af vigtigere Apparater og Instrumenter ikke skulde falde Laboratoriets Drift til Byrde, men anskaffes særskilt ved private Tilskud fra ham, da Laboratoriet ikke, som han havde ønsket, var blevet fuldstændig udstyret, før det overgaves til Bestyrelsen. Og allerede Dagen efter indfrieede han dette Løfte ved i en Skrivelse til Bestyrelsen at tilsige Laboratoriet 1000 Kr. aarlig af sin private Kasse. Af Regnskaberne sees disse 1000 Kr. at være indbetalte i 1877, 1878 og 1879. I sidstnævnte Aar indtraadte Fondet i fuld Rentenydelse af den skjænkede Kapital (se nedenfor S. 18), og da stillede de økonomiske Forhold sig saa gunstigt for Laboratoriet, at det endogsaa kunde oplægge Sparepenge, saa at de private Tilskud fra Jacobsen blev ganske overflødige.

Det første Carlsberg Laboratoriums Ydre er vist efter Tegning af Architect C. F. Thomsen paa Pl. I.

Den første Forandring og Udvidelse af Laboratoriet fandt Sted i Sommeren 1878, da Jacobsen paa egen Bekostning indrettede og monterede de to Værelser L og L'. Det første af disse blev Arbejdsværelse for den Assistent i den kemiske Afdeling, som blev antaget samme Aar, medens Forstanderen for samme Afdeling fik L' til Instrumentværelse og Arbejdsværelse

istedenfor det af ham før benyttede Værelse E. Denne Ombytning blev foretaget, for at den fysiologiske Assistent, naar en saadan blev antaget (dette skete Aaret efter), kunde faae Værelset D, som stødte op til den fysiologiske Afdeling, til Arbejdsværelse. Samtidig blev D sat i Forbindelse med Forstuen A ved en Dør, medens den Dør, som fra Begyndelsen havde været mellem C og A, tilmuredes. Samlinger, Præparater o. a. desl., som tidligere havde haft Plads i D, blev nu tilligemed Størstedelen af Bogsamlingen anbragte i Værelset E, der saaledes blev fælles for begge Afdelinger og var let tilgængeligt fra begge. Til dette Bibliotheksværelse bestilte Jacobsen hos Paul Dubois den Marmorbuste af Pasteur, som nu findes opstillet i det nye Laboratoriums Forhal.

Den anden Forandring og Udvidelse af det ældre Laboratorium skete i 1884. Paa det Sted i Forstuen A, hvor der før havde været en Dør ind til Værelset C, blev en Trappe ført op til første Sal, og her indrettede Jacobsen, ligeledes paa egen Bekostning, til Udvidelse af den fysiologiske Afdeling 3 Værelser svarende til B, C og D i Stuen (samt en Forstue over A) og forsynede dem med de nødvendige Gas- og Vandleddninger. Han havde tænkt sig, at ogsaa samtlige med den øvrige Montering forbundne Omkostninger skulde bæres af ham, men dette mente Bestyrelsen af Hensyn til Laboratoriets daværende gunstige økonomiske Stilling¹ ikke at kunne tage imod. De 3 nye Lokaler paa første Sal, som vi ville kalde B', C' og D', blev derfor monterede for Laboratoriets Regning og tagne i Brug i September 1884. B' blev anvist til Arbejdsværelse for den fysiologiske Afdelings 1ste Assistent, C' til Forstanderværelse, D' blev væsentlig anvendt til Undervisning.

Interiører af det ældre Laboratorium fra 1895 ere gjengivne i to Malerier af O. Haslund i det nye Laboratoriums Festsal². Det ene fremstiller Professor Kjeldahl staaende lænet mod det midterste Arbejdsbord i Værelset F; i Baggrunden sees Døren ind til E. Det andet fremstiller Professor Hansen siddende ved sit Skrivebord i Hjørneværelset C i Stuen ved det Hjørnet nærmeste Vindue i den østlige Gavl. Det Vindue, hvorved Laboratoriekarlen staaer, vender mod Syd.

¹ Sml. nedenfor S. 16.

² Sml. nedenfor S. 13.

Forhandlinger om og Bygningen af det nye Laboratorium.

Siden 1884 er der ikke foretaget væsentligere Forandringer med det ældre Laboratorium. Den Del af Bygningens Stueetage, som paa Grundplanen Pl. I er betegnet med M, og som oprindeligt var bestemt til Udvidelse af Laboratoriet, naar en saadan blev fornøden, fik ikke denne Anvendelse, idet Bryggeriet selv havde Brug derfor til sine Kuldemaskiner. Men allerede før 1884 udtalte Jacobsen jævnlig i private Samtaler, at der maatte tænkes paa en ny Laboratoriebygning til Afløsning af den gamle. Den Forandring og Udvidelse, der skete 1884, var aabenbart for ham kun et foreløbigt Experiment. Allerede samtidig meddelte han Laboratoriebestyrelsen, at et ham tilhørende Grundstykke paa omtr. 21000 Kvadratalen (8400 Kvadratmeter) ved Carlsberg Vej (Matr. Nr. 19 x, Nr. 19 f og g og en Del af Nr. 19 e Valby¹) skulde forbeholdes det nye Laboratorium, 18. Juli 1884 oversendte han en Tegning af dette Grundstykke, og fra nu af vides han stadig og med stigende Interesse at have sysselsat sig med Planen til et nyt Laboratorium, hvor Alt skulde indrettes i større Stil. I Bestyrelsesmødet d. 25. Nov. forhandlede man Sagen og vedtog, at Forstanderne skulde anmodes om inden Marts 1885 at indkomme med Forslag til de nye Lokaler, og allerede før denne Tidsfrist var udløben, fremkom Jacobsen selv med et Udkast til Bygningen. Den skulde have T-Form, omtr. 2000 Kvadratalens Grundflade, en Længde af 60 Alen, to Etager, af hvilke Stuen skulde rumme begge Laboratoriets Afdelinger, medens Salsetagen foreløbig ikke skulde benyttes, men tjene til eventuelle Udvidelser. D. 26. Maj 1885 var Forslaget til Forhandling i Bestyrelsen, som nedsatte et Udvalg, bestaaende af Jacobsen, Barfoed og Jørgensen, til at drøfte Planen og eventuelt ændre den.

Ved nøjere Ovrvejelse fandt man dog, at T-Formen vanskeliggjorde en hensigtsmæssig Fordeling af Lokaler og Belysningsforhold, og to Maaneder efter, 15. Juni 1885, havde Barfoed udarbejdet en anden Plan, hvorefter Bygningen skulde være rektangulær, 60 Alen lang, 20 Alen dyb, med 2 Etager, af hvilke Stuen skulde indeholde den kemiske, Salsetagen den fysiologiske Afdeling. Paa denne Basis førtes alle senere Forhandlinger om

¹ Se A. Fraenkel: *Gamle Carlsberg*, Kjøbenhavn 1897, Pl. III.

en ny Laboratoriebygning. Hvorledes disse videre udviklede sig, og med hvor levende en Interesse Jacobsen omfattede dem, saa at det endog var hans Agt selv at bekoste Bygningen af det nye Laboratorium, medens Laboratoriet kun skulde afholde Monteringen, derom har Bestyrelsen meddelt saa udførlige Oplysninger til Fraenkels Værk om Gamle Carlsberg (S. 466—472), at det her maa være nok at minde om, at Jacobsen ikke opnaaede at se det nye Laboratorium paabegyndt, og at dets Opførelse efter hans Død, 30. April 1887, maatte udsættes, indtil de nye Forhold havde fæstnet sig, hvori Carlsberg Fondet indtraadte 1. Oct. 1888, da det nemlig efter Jacobsens Testamente overtog Bryggeriet Gamle Carlsberg. Først 1891 blev Planen til et nyt Laboratorium optaget paa ny. Byggepladsen blev dog af forskellige Grunde valgt lidt nordligere (Matr. Nr. 19 r Valby¹), men iøvrigt under selv samme Forhold til Veje og Verdenshjørner som i den ældre Plan, der ogsaa bibeholdtes med Hensyn til Bygningens Dimensioner og i alt Væsentligt med Hensyn til Lokalernes Fordeling. Det Bidrag, Jacobsen havde tænkt sig selv at yde til Opførelse af selve Bygningen, kom nu Bryggeriet til at tilskyde. Fondets Direktion tiltraadte nemlig 30. Nov. 1892 Bestyrelsens Indstilling om, at Bryggeriet i 4 Aar maatte bidrage aarlig 50000 Kr., medens Laboratoriet da af sine Sparepenge skulde afholde det Manglende. I Betragtning af den store Andel, Bryggeriet derefter vilde komme til at tage i Udgifterne, bestemtes tillige, at Byggeforetagendet skulde ledes af Bryggeriet under Tilsyn af Bestyrelsens Formand. Tegningen til Laboratoriebygningen og de to Forstanderboliger, som skulde staa i Forbindelse dermed, udførtes med varm Kjærlighed til og Forstaaelse af Opgaven af Architect C. F. Thomsen. Han har ogsaa forestaaet det hele Byggeforetagende med stor Dygtighed og paa den mønsterværdigste Maade, saa at Planen for hvad der hvert Aar skulde være færdigt, punktlig er blevet fulgt. Arbejdet paabegyndtes d. 8. April 1893. Den vanskelige Fundering skete under de gunstigste Vejrforhold. Grundstenen blev lagt af Direktør Kühle d. 28. Juni 1893, og i samme Aar blev Kjælderen opført til Sokkelhøjde. I 1894 blev saavel Hovedbygningen som Forstanderboligerne bragte under Tag. I 1895 opførtes Forbindelserne mellem Boligerne og Laboratoriet, Loftshvælvingerne blev murede og Væggene pudsede i alle 3 Bygninger. I 1896 blev Forstanderboligerne gjort færdige og begge tagne i Brug i Løbet af Sommeren, medens der i Hovedbygningen blev

¹ Se A. Fraenkel, *Gamle Carlsberg* Pl. III.

indlagt Gas, Vand og Elektricitet, ligesom de to Betjentboliger i Laboratoriets Kjælderetage blev gjort færdige. Samme Aar fuldendtes Montering af den kemiske Afdeling, saa at denne kunde tages i Brug i Slutningen af 1896, den fysiologiske Afdeling begyndte sin Virksomhed i Aug. 1897.

Indvielsen af den hele Bygning fandt Sted i Nærværelse af det kongelige Danske Videnskabernes Selskab paa Bryggeriet Gamle Carlsbergs Halvtredsindstyveaars-Jubilæumsdag, d. 10. Nov. 1897.

Efter Indvielsen afslørede Direktionens Formand, Professor Edv. Holm, ligeledes i Nærværelse af Videnskabernes Selskab og af Gamle Carlsbergs Arbejdere og Funktionærer, en af G. V. Bissen udført Bronzestatue af J. C. Jacobsen i Haveanlægget foran Bygningen. En Gjengivelse af den findes foran i dette Skrift. Tanken om at hædre Mindet om den Afdøde paa denne Maade var udgaaet fra Gamle Carlsbergs Arbejdere, som kort efter hans Død begyndte at henlægge Penge til et Mindesmærke for ham. Til dem sluttede sig derefter Bryggeriets og Laboratoriets Funktionærer og Haandværksmestre samt Carlsberg Fondet. Statuen fremstiller Jacobsen i hans kraftige Manddomsalder, og den er som et Symbol paa, at det nye Laboratorium er viet til ved dygtig og energisk Virksomhed at være et levende Mindesmærke om den varme Fædrelandsven, som stiftede det.

Hvorledes Udgifterne til det nye Laboratoriums Bygning og Indretning ere udredede, og hvorledes de have fordelt sig i de forskellige Aar, indtil det maatte betragtes som fuldstændig færdigt, og paa de forskellige Conti, vil man kunde danne sig en Forestilling om af hosføjede Tabel. Det vil ogsaa af denne sees, at Bryggeriet af den samlede Udgift 531096 Kr. 54 Ø. har udredet 256615 Kr. 07 Ø., altsaa næsten Halvdelen, og at det saaledes har tilskudt 56615 Kr. 07 Ø. mere, end det oprindeligt havde lovet.

Udgifter ved det nye Laboratoriums Bygning og Indretning.

	Summa	Udredet af:	Bygning	Inventar	Varme-apparat	Ledninger	Elektrisk Belysning	Haven
	Kr.		Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.
1892—1893 ¹ ..	43865. 44	Bryggeriet	43865. 44	»	»	»	»	»
1893—1894 ...	141668. 02	{ Kr. 41668. 02 af Bryggeriet Kr. 100000 af Laboratoriet	141668. 02	»	»	»	»	»
1894—1895 ...	63326. 35		61674. 06	»	»	»	466. 54	1185. 75
1895—1896 ...	107755. 26		45668. 96	634. 43	35607. 08	14569. 86	6466. 96	4807. 97
1896—1897 ...	85754. 10	Laboratoriet	38827. 05	35654. 11	3400. 56	2713. 66	2600. 97	2557. 75
1897—1898 ...	76206. 14	Laboratoriet	53100. 78	18645. 25	1080. 40	257. 66	1027. 25	2094. 80
1898—1899 ...	12521. 23	Laboratoriet	3427. 66	8034. 25	1059. 32	»	»	»
	531096. 54		388231. 97	62968. 04	41147. 36	17541. 18	10561. 72	10646. 27

¹ D. e. 1. Oct. 1892—30. Sept. 1893. Sml. S. 17.

Det nye Carlsberg Laboratorium

er opført i italiensk Renæssancestil af røde Mursten med Sokkel og Hjørner af Granit. Det er beliggende i et mindre Haveanlæg mellem Carlsberg Vej og Bjerregaardsvej i Valby (Pl. II) og staaer ved Loggia'er og lukkede Gange i Forbindelse med to Forstanderboliger. Grundplanet er væsentlig rektangulært, dog med et fremspringende Parti mod Vest. Hovedfacaden med Indgangsdøren vender mod Øst ud til Carlsberg Vej (Pl. III). Vestfacaden er vist Pl. IV. I Stueetagen har den kemiske, i Salsetagen den fysiologiske Afdeling sine Lokaler. Disse ere i Stuen $6\frac{3}{4}$ Al. (4,24 M.), i Salsetagen $7\frac{1}{2}$ Al. (4,71 M.) høje. Værelsernes Gulve ere overalt belagte med ensfarvet Linoleum undtagen i Festsalen, hvor der er Parketgulv, og i Laboratoriet for større Arbejder, Stinklaboratoriet og Opvaskerummene, hvor Gulvene ere asfalterede. Loftet udgjøres i alle Lokaler af flade, murede Hvælvinger, baarne af Jernbjælker. Inventariet er gennemgaaende udført i Teaktræ og Fyrretræ og lakeret med en lys Lak, saa at Træets naturlige Farve væsentlig er bevaret. I Festsalen er Møblementet af Teaktræ, i Forstandernes Læseværelser af Mahogny, i de Rum, hvor Gulvet er asfalteret, er Inventariet af malet Fyrretræ. I næsten alle Lokaler er indlagt Vand fra Valby Vandværk, Gas fra Frederiksberg Gasværk og Elektricitet, som leveres uden Vederlag af Bryggeriet. Bygningen er forsynet med et Anlæg til Opvarmning ved Hjælp af varmt Vand, hvortil Varmefrembringerne ere opstillede i Kjælderen i det fremspringende Parti mod Vest. Herfra drives det varme Vand op i et Rørsystem paa Loftet, hvorfra det ved nedløbende Rør fordeles til Varmelegemer i de forskellige Lokaler, og derfra gaaer det igjen til Varmefrembringerne. Luften i Lokalerne fornyes ved en Friskluftskanal under Korridoren i Kjælderen (Pl. VII), hvorfra om Sommeren Luften ved elektriske Ventilatorer drives op i Lokalerne gennem murede Kanaler i det tykke Hovedskillerum. Om Vinteren forvarmes den friske Luft, idet den træder ind i Kanalerne, ved der opstillede Varmelegemer. Den benyttede Luft føres bort gennem Skorstene, som ere førte op over Bygningens Tag. Endelig findes der et Rørledningsnet, som dels fører fra en Vandbeholder under Bygningens Tag til Kørtingske Vandluftpomper paa forskellige Steder i Laboratoriet, dels fra disse til en Beholder i Kjælderen, hvorfra Vandet igjen pompes op til den øverste Beholder ved en elektrisk Pumpe.

som gaaer i Gang af sig selv, naar Vandet i den øverste Beholder er sunket et bestemt Stykke.

Gjennem Hoveddøren kommer man ind i Forhallen A (Pl. V), der med det tilstødende Trapperum B indtager hele den midterste Del af Hovedbygningen i en Bredde af 16 Al. (10,04 M.). Umiddelbart inden for Døren fører en Granittrappe paa hver Side ned til de i Kjælderen værende Boliger for Laboratoriets Betjente, medens en bred Trappe mellem to Søjler af poleret Granit, der bære Loftet, fører op til Gulvet i den egentlige Forsal. Dette er lagt med brune og graa Ølandsfliser, medens Væggene ere beklædte med Marmorplader i rødliggule og blaaliggraa Farve. I Trapperummet, som har Ovenlys, fører dels en Granittrappe ned til Kjælderen, dels en bred Trappe af Veroneser-Marmor i 4 Løb op til første Sal. I Forhallen er paa Fodstykker af poleret Granit opstillet to Marmorbuster, den ene (1) af Pasteur (se ovenfor S. 5), den anden (2) af Liebig. Tre Døre, udførte i poleret Mahogany og indfattede i Rammer af grønligt Marmor, føre til det kemiske Laboratoriums Lokaler. Forhallen og Trappen oplyses om Aftenen af to Buelamper, hver paa ca. 600 Lys.

Det kemiske Laboratorium har følgende Lokaler (sml. Pl. V):

C. Forstanderens Laboratorium.

1. Arbejdsbord, som i hver Ende har en større, firkantet Fajancevask med Kørtingsk Vandluftpompe. — 2. Arbejdsskab med Aftræk. — 3. Større Arbejdsskab med konstante Vandbade og en Kørtingsk Pompe. — 4. Bord med Reagensskab, hvis Skydedøre have gule Glasruder. — 5. Bord, hvorpaa Opsats med Hylde. — 6. Bord med Skiferplader, Fajancevask og Kørtingsk Pompe. — m. Mørkerum.

D. Forstanderens Læsestue.

1. Bord med indlagt Fajancevaskeumme. — 2. Reol. — 3. Sofa. — 4. Skrivebord. — 5. Læsepult. — Døren i den søndre Væg fører ind til Forstanderens Bolig.

E. Forstanderens Vejestue.

F. Stinklaboratorium.

1. Arbejdsbord. — 2. Bord med Skiferplade, Fajancevask og Kørtingspumpe med Blæseapparat. Pumpen staaer ved Ledning i Forbindelse med Arbejdsskabet 3. — 4. Skab af almindelig Bordhøjde.

G. Opvaskerum.

1. Rørkedel til Opvarmning af Vand. — 2. Trævask. — 3 og 4. Borde.

H. Præparatværelse.

1 og 2. Præparatskabe med gule Glasruder i Dørene. — 3. Mindre Skabe, af hvilke det ene har en Beholder med brændt Kalk i Bunden. — 4. Bord.

I. Passage fra Forstanderens Laboratorium C til Assistenternes K.

1. Højt Skab. — 2. Større Tørrekasse. — 3. Telefon.

K. Assistentlaboratorium.

1. Arbejdsbord, som i hver Ende har en firkantet Fajancevask og en Kørtingspumpe. — 2. 2. Reagensskabe med med gule Glasruder i Skydedørene. — 3. 3. Mindre Arbejdsskabe. — 4. Større Arbejdsskab. — 5. Arbejdsskab til Forbrændingsanalyser. — 6. Skammel med 2 Gasometre og Fajance-Afløbskumme. — 7. Smalt Bord. — 8. Bord med Skiferplade, halvrund Fajancevask, Svalevandshaner og Afløbsnæb. — 9. 9. To Arbejdsborde med Opsats. — 10. 10. Skriveborde.

Paa hver Side af det lille Forrum ud mod Forhallen findes under Trappen et lille mørkt Rum, x og y. Det første benyttes som Garderobe, det andet, hvor der er højere til Loftet, er bestemt til Polarisering og udstyret dertil, bl. a. ved Aftræk til Skorstenen.

L. Fysisk Laboratorium (hidtil væsentlig kun benyttet til Vejestue for Assistenterne).

1. Bord med firkantet Fajancevask. — 2 og 3. Instrumentskabe. — 4. Apparat til Vacuumsdestillation af Kvægsølv. — 5 og 6. Sofa og Bord.

M. Fremmedlaboratorium.

1. Bord med firkantet Fajancevask, hvorover en Kørtingspumpe med Blæser. — 2. Reagensskab med gule Glasruder i Skydedørene. — 3. Arbejdsskab af en lidt anden Konstruktion end de øvrige. — 4. Skab. — 5. Skab til den analytiske Vægt. — 6. Skrivebord.

N. Laboratorium for større Arbejder.

1. Arbejdsbord med firkantet Fajancevask, hvorover en Kørtingspumpe. — 2. Lavere Arbejdsbord med Skiferplade. — 3. Bord med Skruepresse. — 4. Varmluftsmaskine, der driver et Røre- og Rysteapparat samt en Kuglemølle (5.) — 6. Isskab. — 7. Perrots Gasovn. — 8. Iskusekasse. — 9. En Dreefsk Mølle.

O, som er bestemt til Magasin.

I alle Laboratoriets Arbejdsskabe ere Bagvæggene beklædte med Mælkeglas, Bundfladen med Fajancefliser. I de fleste ere

Skydedørene kontrabalancerede og delte efter en vandret Linie i 2 Dele, en større foroven og en mindre forneden, som kunne bevæges uafhængigt af hinanden, saa at der kan arbejdes i Skabet med den mindst mulige Aabning ud til Lokalet. I Reglen indeholde Arbejdsskabene mindre Fajancevaske og ere forsynede med let kjendelige Haner til Luftledning, Vacuum, Svalevand og Afløbsnæb for dette.

Arbejdsbordene ere 0,97 M. høje. De fleste have Skuffer og Underskabe. Naar disse ere anbragte ud for Vinduerne, ere de jævnlig gjort lyse ved Indlæg af en tyk Glasplade i Bordpladen. I Reglen ere Arbejdsbordene forsynede med de samme Haner som Arbejdsskabene.

I Alt findes i den kemiske Afdelings Lokaler: 92 Gashaner, 21 Vandhaner, 29 Svalevandshaner, 17 Lufthaner, 26 Afløbsnæb, 6 Kørtingske Vandluftpomper, 7 do. med Blæseapparat, 8 større Vaske, 11 mindre Vaske og 46 Glødelamper.

Gangen ved den nordlige Side af O staaer ved en lukket Korridor i Forbindelse med den fysiologiske Forstanders Beboelseslejlighed og ved en Trappe (paa den vestlige Side af O) med hans Læseværelse (B paa Pl. VI).

Den brede Marmortrappe fra Forsalen fører til Korridoren R paa første Sal (Pl. VI), hvorfra Indgangen er til Festsalen A. I dette smukke Rum findes mellem Vinduerne Marmorbuster af J. C. Jacobsen og H. C. Ørsted, begge af Herm. Vilh. Bissen, og paa Væggen ligefor Vinduerne Portræter af Carlsberg Fondets første Direktion, Madvig og Edv. Holm, malede af Carl Bloch, Barfoed, Panum og Jap. Steenstrup, malede af Aug. Jerndorff. Paa Endevæggene findes to store Interiører fra det gamle Laboratorium, malede af Otto Haslund, med Portræter af Professor Emil Chr. Hansen og afd. Professor Joh. Kjeldahl¹. De første 5 Portræter lod Jacobsen udføre med den udtrykkelige Bestemmelse, at de skulde ophænges i det nye Laboratoriums Festsal, naar et saadant blev bygget. De to Interiører ere skjænkede af Bryggeriet »som et anskueligt Minde om Laboratoriets første beskedne Hjem, hvorfra der er fremgaaet videnskabe-

¹ Af alle 7 Malerier findes Beskrivelser og Gjengivelser i E. F. Lund: *Danske malede Portraiter*.

lige og praktiske Resultater, som fremtidige Arbejder paa det Laboratoriet anviste Forskningsomraade ikke ville have let ved at fordunkle, et Minde, hvorved tillige Erindringen om de Mænd, som ved deres Arbejde have grundlagt Laboratoriets Ry, kan bevares¹.

Ligesom Lokalerne i den kemiske Afdeling ere beliggende over Forhallen og Trapperummet, saaledes ere de i den fysiologiske beliggende omkring Festsalen og Trapperummet, og her som der er Anordningen blevet noget afhængig heraf, men i den fysiologiske Afdeling er den tillige blevet noget afhængig af Skillerrummene i den kemiske.

I den *fysiologiske Afdeling* er (se Pl. VI):

B. Forstanderens Læseværelse.

1. Arbejdsbord med Underskabe. — 2. Bogskab. — 3. Vask. — 4. Jernskab. — 5. Skrivebord. — 6. Bevægelig Reol. — Værelset staaer ved Trappe til Stuen og en Gang her i let Forbindelse med Forstanderens Beboelseslejlighed.

C. Forstanderens Arbejdsværelse.

1. Arbejdsbord med Underskabe og Vask. — 2., 3. og 4. Tre store Kulturskabe. — 5. Et lille Skab med vigtige Ren-Kulturer, og saaledes indrettet, at det i Ildebrandstilfælde let kan tages ned og bæres bort af en enkelt Person. — 6. Forsøgsbord med Underskab. — 7. Skrivebord for Assistenten. I Passagen fra C mellem D og E: 8. Arbejdsbord.

D. Varmerum,

indrettet som en stor Thermostat til talrige Kulturer. Rummet er 2,5 M. højt, 1,6 M. bredt og 1,6 M. dybt. — 1. 1. 1. Bevægelige Hylde. Vægge og Lofte ere byggede af to Lag hule Sten, hvorimellem er Benkul. Døren er hul og fyldt med Infusoriejord. Opvarmningen skeer ved Vand, der varmes udenfor Rummet (i Beholderen 5 i F) og cirkulerer gennem et Kobberrør (9,6 M. langt, 0,04 M. i Tvermaal), som ligger 0,55 M. over Gulvet. Fra Thermostatrummet F rager en Reichertsk Thermoregulator og et Thermometer ind i D, hvis Temperatur (sædvanlig 25°) altsaa kan aflæses i F. Desuden har Væggen 2 Aabninger, som ere lukkede med Bomuld. D belyses af en elektrisk Glødelampe, som tændes, naar man gaaer derind, og slukkes, naar man gaaer ud igjen.

¹ Af Bryggeridirektør Kühles Indstilling til Fondets Direktion.

- E. Det sterile Rum
er malet med Emaillefarve, har ingen Gardiner eller Rørledninger. Ruderne mod Vest ere malede, Vinduet mod Nord tilkittet, Rummet er betydeligt lavere end de øvrige Lokaler, Alt beregnet paa at undgaa Støv. — 1. og 2. Arbejdsborde.
- F. Thermostatrum.
1. Panums Thermostat¹. — 2. 2. 2. Tre Rohrbeckske Thermostater. — 3. Étuve d'Arsonval. — 4. Magasinskab. — 5. Beholder til Opvarmning af D. — 6. og 7. Borde med Underskabe. — 8. Vask.
- G. Kemisk Laboratorium.
1. og 2. Arbejdsborde med Vask, Kørtingsk Pompe, Haner til Svalevand og Afløbsnæb osv. — 3. Bord med Reagensskab, hvis Skydedøre have gule Ruder. — 4. Arbejdsskab som i den kemiske Afdeling.
- H. Mørkekammer
til fotografisk Brug og til Forsøg i Mørke. 1. Bord med Underskab og Vask. — 2. Reol, hvor der er magasineret Carlsberg Kar med steriliseret Urt.
- I. Assistentlaboratorium.
1. Bord med Underskabe og Vask. — 2. Bord med Underskab. — 3. 4. 5. Kulturskabe (3. med Glasdøre til Kulturer i Lys).
- K. Sterilt Rum,
indrettet som E.
- L. Bibliothek.
1. og 2. Store Reoler. — 3. Skab med Samling af tørrede Svampe. — 4. Bord. — 5. Stort Mikrofotografi-Apparat. — 6. (udenfor paa Gangen) Skab til Clichéer, Klodser, Kobberplader.
- M. Undervisningslaboratorium.
1. og 2. Kulturskabe. — 3. og 4. Arbejdsborde med Underskabe. — 5. Bord med Underskabe og Vask med en Kørtingspumpe. — 6. Schribaux' Thermostat.
- N. Magasin.
1. 2. 3. 4. Store Skabe. — 5. Mindre Skabe. — 6. Løst Bord. — 7. 8. og 9. Varmekasser til Sterilisation ved tør Varme.

¹ Beskrivelse med Tegning i *C. L. Medd.* 1, 48.

O. Sterilisationslokale.

1. Apparat til Sterilisation med strømmende Vanddamp. —
2. Autoklav til Sterilisation under Tryk. — 3. Bord med Skiferplade og en Række Haner, der levere steril Luft under Tryk. — 5. Bord med Underskab. — 5. og 6. Skabe.

P. Opvaskerum.

1. Bord med stor Vask. — 2. Varmtvandsapparat. — 3. Bord med Underskabe. — 4. Reol. — 5. Stort Skab.
- Gulvet er asfalteret og forsynet med Afløb for Spildevand.

Laboratoriets Formuesforhold.

Ved sit første Gavebrev, hvorved Fondet stiftedes, sikrede Jacobsen det en Kapital af 1 Million Kroner, som skulde forrentes med 5% aarlig, men dog saa længe han selv og hans Hustru levede, kun med 2% p. a. Fondets aarlige Indtægt var altsaa dengang 20000 Kr.. Deraf afholdtes bl. a. Laboratoriets Driftsudgifter, men da disse næsten aldrig have været saa store som de af Laboratoriebestyrelsen vare budgetterede, fremkom der vel ogsaa i de 3 første Regnskabsaar et Overskud, men dette indgik indtil d. 25. Sept. 1879 i Fondets øvrige Formue for at finde Anvendelse til dets andre Formaal. Men allerede 27. Jan. 1879 tilskrev Jacobsen Fondets Direktion, at han fra 25. Sept. s. A. gav Afkald paa det ovennævnte Forbehold, at den skjænkede Kapital i hans og hans Hustrues Levetid kun skulde forrentes med 2% p. a. Fra sidstnævnte Datum voxede Fondets Indtægter saaledes pludselig til 50000 Kr. aarlig, og fra 1. Okt. 1879 til 1. Okt. 1881 havde Laboratoriet en fast aarlig Indtægt af 25000 Kr. Ved sit tredie Gavebrev af 22. Aug. 1881 forøgede Jacobsen yderligere Fondets Formue med 1 Mill. Kroner og Laboratoriets aarlige Indtægt med 10000 Kr. Ved denne stærke Stigen af Laboratoriets Indtægter, blev dets økonomiske Stilling saa gunstig, at det hvert Aar kunde oplægge betydelige Summer som Sparepenge, for hvilke der siden blev Anvendelse ved Bygningen og Indretningen af det nye Laboratorium. Fra 1. Okt. 1881 til 1. Okt. 1896 havde Laboratoriet herefter en fast aarlig Indtægt af 35000 Kr. Men efter at Carlsberg Fondets Grundfond havde naaet den ved Direktionens Beslutning¹ fastsatte Størrelse af

¹ Sml. Tillæg til Fundats for Carlsberg Fondet af 25/9 76 § 8 (*Aktstykker vedrør. Carlsberg Fondet. Kbh. 1894. S. 68*).

6 Millioner Kroner, er det i 4. Tillæg til Statutterne § xxxii bestemt, at Nettooverskuddet af Bryggeriet og Grundfondet fra 1. Okt. 1896 skal anvendes saaledes, at først Administrationsudgifterne og de aarlige Summer, som allerede Jacobsen havde bestemt til hver af Fondets tre Afdelinger (altsaa for Laboratoriet 35000 Kr.), afholdes deraf, medens af Resten $\frac{1}{4}$ henlægges til et Reservefond og de $\frac{3}{4}$ fordeles mellem Afdelingerne paa en saadan Maade, at Laboratoriet faaer $\frac{1}{5}$ af den Sum, der fordeles. For Aaret 1895—96 har Laboratoriets Andel i Overskuddet (altsaa foruden de 35000 Kr.) været 53931 Kr. 82 Øre, for 1896—97 63000 Kr., for 1897—98 27270 Kr. 90 Øre, for 1898—99 62544 Kr. 57 Øre, for 1899—1900 72605 Kr. 52 Øre.

I omstaaende Tabel vil man finde en Oversigt over Laboratoriets Udgifter og Formuesforhold i de forløbne 25 Aar. Da imidlertid Regnskabsaaret gaaer fra 1. Okt. det ene Aar til 30. Sept. det næste, har Forholdene for det sidste halve Regnskabsaar ikke kunnet medtages, saa at Angivelserne for Aaret 1900/1901 kun gjælde fra 1. Okt. 1900 til 1. April 1901. Ved »Forbrug» forstaaes Brændsel, Gas, Kemikalier o. l., ved »Inventar» Anskaffelse af nye eller Reparation af ældre Apparater, Instrumenter, Borde, Skabe, Ovne m. m. Under »Forskjellige Udgifter» er siden 1. Okt. 1898 paa Budgettet samlet en Del heterogene Udgifter, som det nye Laboratoriums Drift har medført. Ogsaa Skatter og Assurance af Bygningerne er en Udgift, som ikke kjendtes i det gamle Laboratoriums Tid. Under »Rejser» er opført Understøttelser, som i dette Øjemed i Aarenes Løb ere tilstaaede Forstanderne og undertiden ogsaa Assistenterne. Opgjørelsen af Formuen gjælder sidste Dag i vedkommende Regnskabsaar, den sidste Opgjørelse 1. April 1901. Til Formuen maa dog ogsaa henregnes det gjældfrie nye Laboratorium med Forstanderboliger.

Regn- skabsaar	Budget- teret Drifts- udgift	Virkelig Driftsudgift	De virkelige Driftsudgifter			
			Lønninger	Forbrug	Inventar	Bog
	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.
1876—1877	11400. »	10443. 44	6806. 66	1019. 59	2574. 71	42
1877—1878	12500. »	8930. 24	4340. 01	946. 95	2180. 38	394
1878—1879	13500. »	9857. 02	6876. 99	1104. 77	1816. 51	38
1879—1880	17000. »	14848. 75	9250. »	1477. 70	1735. 18	463
1880—1881	15600. »	15208. 69	10425. 73	1458. 33	2389. 19	212
1881—1882	19300. »	17575. 49	11836. 05	1855. 61	2326. 10	314
1882—1883	19300. »	18343. 60	11980. »	2314. 52	1908. 43	346
1883—1884	20340. »	19840. 21	13590. »	2027. 04	2684. 78	224
1884—1885	26090. »	24512. 06	16315. »	2653. 39	3098. 44	168
1885—1886	24640. »	23177. 65	16440. »	2472. 73	2436. 59	188
1886—1887	22940. »	21646. 43	15880. »	2338. 77	2564. 44	187
1887—1888	22580. »	21909. 31	14770. »	2143. 89	2571. 50	291
1888—1889	24080. »	22184. 38	16230. »	2104. 34	2710. 15	240
1889—1890	24880. »	22942. 80	17980. »	1756. 33	3006. 44	190
1890—1891	24580. »	23251. 70	17105. »	1797. 51	2072. 83	250
1891—1892	24280. »	22834. 19	17446. 67	2002. 37	2853. 95	229
1892—1893	26300. »	23555. 76	18300. »	2620. 51	2453. 09	311
1893—1894	27116. 67	25443. 77	19999. 84	2086. 61	1803. 12	380
1894—1895	28200. »	27362. 27	20550. »	2331. 69	2068. 04	432
1895—1896	30350. »	29405. 65	21610. »	2467. 42	1975. 76	653
1896—1897	35405. »	35589. 98	22754. 99	4420. 01	4508. 55	443
1897—1898	41953. 33	42057. 25	23635. »	5576. 12	7568. 06	440
1898—1899	40570. »	39809. 44	25370. »	5330. 11	4452. 34	318
1899—1900	40920. »	37828. 16	25470. »	3703. 11	3301. 06	463
$\frac{1}{10}$ 00— $\frac{1}{4}$ 01	21414. 17	21738. 51	11668. 34	1983. 16	403. 36	200
I Alt...	615239. 17	581286. 75	396600. 28	59992. 58	67463. »	7432

¹ Montering af de nyindrettede Lokaler for fysiologisk Afdeling. ² Heri Mont
Anledning af Bryggeriets Jubilæum: 1889 Kr. 98 Ø. ⁴ I 18⁹³/₉₄ afholdt Laborat
12521 Kr. 23 Ø. af de med Bygning og Indretning af det nye Laboratorium forbu

Laboratoriet fordele sig paa nedenstaaende Conti:						Formue	Regn- skabsaar
Is- tets velse	Rej- ser	Skatter og Assurance af Byg- ningen	Reparation af Lokaler, Bygninger og Varme- apparat	Forskjel- lige Ud- gifter	Extraord. og ufor- udsete Udgifter		
Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	Kr.	
"	"	"	"	"	"	"	1876—1877
3. 42	"	"	"	"	"	"	1877—1878
0. 60	"	"	"	"	"	"	1878—1879
1. 92	200	"	"	"	"	8388. 04	1879—1880
2. 97	"	"	"	"	"	16533. 18	1880—1881
3. 25	700	"	"	"	"	30889. "	1881—1882
2. 82	700	"	"	"	"	44960. 21	1882—1883
3. 93	500	"	"	"	"	57879. 66	1883—1884
"	1000	"	"	"	1276. 48 ¹	66935. 79	1884—1885
9. 67	"	"	"	"	"	77350. 46	1885—1886
"	500	"	215. 29	"	"	90844. 21	1886—1887
9. 24	500	"	162. 74	"	"	103993. 77	1887—1888
"	700	"	174. 44	"	25. 35	116993. 31	1888—1889
0. "	"	"	"	"	"	129892. 20	1889—1890
5. 80	500	"	"	"	"	142548. 17	1890—1891
2. 20	"	"	"	"	50. "	156209. 50	1891—1892
0. 69	"	"	"	"	100. "	169058. 14	1892—1893
6. 38	"	"	"	"	147. 55	72753. 88 ⁴	1893—1894
9. 62	1100	"	"	"	"	78635. 15	1894—1895
5. 51	"	"	"	"	2543. 24 ²	82818. 66	1895—1896
0. 24	"	"	"	"	"	52590. 47 ⁴	1896—1897
7. 59	1200	"	"	"	2080. 58 ³	34112. 67 ⁴	1897—1898
4. 03	400	354. 57	"	1511. 04	388. 95	46132. 84 ⁴	1898—1899
9. 62	400	930. 28	691. 40	1595. 66	683. 45	104145. 83	1899—1900
3. 28	"	474. 25	2889. 96	948. 48	1206. 79	174056. 90	$\frac{1}{10}$ 00— $\frac{1}{4}$ 01
7. 78	8400	1759. 10	4133. 83	4055. 18	8502. 39		

Assistentboligerne i de nye Forstanderboliger: 1851 Kr. 44 Ø. ³ Heri Gratialer i 000 Kr., i 18^{96/97} 85754 Kr. 10 Ø., i 18^{97/98} 76206 Kr. 14 Ø. og i 18^{98/99} gifter.

Laboratoriets Personale.

Af Forstanderne har Professor Kjeldahl været knyttet til Laboratoriet lige fra dets Tilblivelse, og han var Forstander for dets kemiske Afdeling fra 1. Okt. 1876 til sin Død d. 18. Juli 1900. I hans Sted ansattes Dr. phil. S. P. L. Sørensen fra 1. Jan. 1901, før hvilket Tidspunkt han af private Grunde ikke kunde tiltræde Stillingen. I Mellemtiden fra 1. Sept. til 31. Dec. 1900 var Afdelingens ældste Assistent Cand. polyt. H. Jessen-Hansen konstitueret som Forstander.

Ogsaa Cand. med., nuværende Professor, R. Pedersen var ansat ved Laboratoriet allerede før det gik over til Fondet, men virkede kun omtrent et Aar som Forstander for den fysiologiske Afdeling (1. Okt. 1876—31. Dec. 1877). I 1878 havde den fysiologiske Afdeling ingen Forstander, men ved et privat Engagement af Jacobsen arbejdede daværende Cand. phil., nuværende Professor, Dr. phil. Emil Chr. Hansen der hele Aaret og udførte der en Række gjæringsfysiologiske Undersøgelser. Den 1. Jan. 1879 konstitueredes han (men med fuld Gage) og 1. Okt. s. A. ansattes han som Forstander for den fysiologiske Afdeling¹.

Som Assistenten have følgende Mænd virket ved Laboratoriet i de angivne Tidsrum².

I den kemiske Afdeling:

Cand. polyt. A. Therkelsen 1. Sept. 1878—1. Juli 1879 (død som Belysningsdirektør i Kjøbenhavn).

Cand. polyt. A. Weis 1. Nov. 1879—1. Febr. 1881 (nu Adjunkt ved Metropolitanskolen).

Cand. pharm. W. Johannsen 1. Mai 1881—1. Nov. 1883 og, efter et Studieophold i Tübingen, igjen 1. Sept. 1884—1. Okt. 1887 (nu Lektor i Plantefysiologi ved Landbohøjskolen).

¹ Om Forstandernes Liv og Virksomhed henvises dels til *Biografisk Lexikon*, dels til A. Fraenkels Værk: *Gamle Carlsberg*, dels, for Kjeldahls Vedkommende, til 5. Bds. 1. Hefte af nærværende Tidsskrift, endelig til den Oversigt over Carlsberg Laboratoriets Virksomhed, som findes nedenfor (S. 24—49).

² I det første Regnskabsaar havde Laboratoriet ikke Assistenten. Kun i de to første Maaneder deltog Cand. polyt. Leth (nu Inspektør ved Vestre Hospital), som paa anden Maade var i Bryggeriets Tjeneste, i Arbejderne i den kemiske Afdeling.

- Cand. polyt. Ph. Gram 20. Mai 1881—1. Jan. 1884 (nu Kontrollør ved Ølbeskatningen).
- Cand. polyt. L. Knudsen 1. Jan. 1884—1. Sept. 1885 (død, ansat paa Ny Carlsbergs Laboratorium).
- Cand. polyt. J. G. Forchhammer 1. Sept. 1885—1. Sept. 1886 (nu Forstander for Døvstumme-Institutet i Nyborg).
- Cand. mag. (i Kemi) R. Koefoed 1. Okt. 1887—1. Marts 1890 (nu teknisk Direktør paa Gamle Carlsberg).
- Cand. polyt. Hagen Petersen 1. Okt. 1889—1. Dec. 1891 (nu Assistent i Meyer & Dethlefsens Laboratorium).
- Cand. polyt. H. Jessen-Hansen 1. Jan. 1892—
- Cand. polyt. C. Ivan Olsen 1. Febr. 1892—1. Sept. 1894 og 15. Okt. 1895—1. Mai 1896 (nu Brygmester i Christiania, har antaget Navnet C. Ivan).
- Cand. polyt. N. Hjelte Clausen 1. Sept. 1894—1. Jan. 1898 (nu Laboratorieforstander paa Ny Carlsberg).
- Cand. polyt. C. Pedersen 1. Jan. 1898—
- Cand. mag. (i Plantefysiologi) F. Weis 1. Nov. 1898—.

I den fysiologiske Afdeling:

- Cand. pharm. V. Rosing 15. Okt. 1879—1. Jan. 1881 (død, ansat paa et Bryggeri i Nordtyskland).
- Cand. polyt. L. Knudsen 1. Okt. 1882—1. Jan. 1884 (se ovenfor).
- Cand. polyt. Ph. Gram 1. Jan. 1884—1. April 1885 (se ovenfor).
- Cand. polyt. S. V. Poulsen 1. Mai 1885—1. Jan. 1888 (død).
- Cand. phil. J. C. Holm 15. Sept. 1884—1. Juni 1891 (nu Laboratorieforstander hos Direktør Alfr. Jørgensen).
- Cand. pharm. J. Chr. Nielsen 1. Aug. 1888—1. Juni 1893 (nu Apotheker i Nykjøbing paa Falster).
- Cand. pharm. & phil. A. Klöcker 1. Febr. 1892—.
- Cand. polyt. H. Schiønning 1. Jan. 1894—.

For Tiden er altsaa Hr. Jessen-Hansen ordinær og d'Hrr. C. Pedersen og F. Weis ekstraordinære Assistenten i den kemiske Afdeling, Hr. Klöcker ordinær og Hr. Schiønning ekstraordinær Assistent i den fysiologiske Afdeling.

Hvad Personalets Lønningsforhold angaaer, var det i Statutterne fastsat, at Forstandernes Gage skulde være mindst den samme som for Universitetsprofessorer med samme Tjenestetid. Hertil føjede Jacobsen imidlertid allerede i Bestyrelsesmødet d. 23. Nov. 1877 Fribolig som fast Emolument. Universitetsprofessorernes Lønning var fastsat ved Lov af 25. Marts 1871, hvorefter deres

Gage begyndte med 3200 Kr., hvert femte Aar steg med 600 Kr. og efter 25 Aars Tjenestetid naaede 6000 Kr. I Lovens sidste Paragraf fandtes dog den Bestemmelse, at Loven skulde revideres inden Udløbet af Finansaaret 18⁸⁰/₈₁. I Overensstemmelse hermed forelagde Regeringen i 1879 et Lovforslag om Universitetsprofessorernes Lønninger, og herefter vilde de blive i væsentlig Grad forhøjede. Men da dette Lovforslag endnu ikke var behandlet af Folkethinget i Sessionen 18⁸²/₈₃, saa foreslog Jacobsen i Skrivelse af 25. Aug. 1883 til Bestyrelsen, at der fra nu af skulde tillægges Laboratoriets Forstandere den Gageforhøjelse, som af Regeringen var foreslaaet for Universitetsprofessorerne. Jacobsens Forslag blev vedtaget, om end ikke i fuld Udstrækning, og Lønningsforbedringen, som traadte i Kraft d. 1. Okt. 1883, kom til at gaa ud paa, at Forstanderne fik et aarligt Tillæg af 1200 Kr. for de første ti Tjenestear, og for de næste fem Tjenestear et aarligt Tillæg af 800 Kr. Da Lov af 12. April 1892 om Universitetets Lønningsforhold udkom, ordnedes Forstandernes Lønning i Overensstemmelse hermed. Herefter er nu Begyndelseslønnen 3600 Kr., og den stiger hvert femte Aar med 600 Kr., dog at Lønningen ikke kan overstige 6000 Kr. I 1888 fik Kjeldahl og Hansen Tilsagn om Pension som Statens Embedsmænd, i alt Væsentligt i Overensstemmelse med Lov af 5. Jan. 1851. Ved det nye Laboratorium er der indrettet to rummelige Forstanderboliger, hvor Forstanderne have fri Bolig med Varme og Lys.

Assistenterne lønnedes oprindelig med 1200 Kr. aarlig. De fleste have haft en tildels møbleret Fribolig for en Ugift paa Gamle Carlsberg. Af og til er der tilstaaet en Assistent, som havde fungeret i længere Tid, et personligt Lønningstillæg. Fra 1. Okt. 1893 ere Assistenternes Lønninger stigende. De ordinære Assisterter (een i hver Afdeling) lønnes i de to første Tjenestear med 1500 Kr. aarlig, i de to næste med 1700 Kr. aarlig, i det femte med 1900 Kr. og derefter med 2000 Kr. aarlig. Extraordinære Assisterter lønnes i de to første Tjenestear med 1200 Kr. aarlig, i det tredie med 1400 Kr. og derefter med 1500 Kr. aarlig. De to nuværende ordinære Assisterter, som begge ere gifte, have desuden haft en aarlig Huslejegodtgjørelse af 400 Kr. og fra 1. Okt. 1898 af 600 Kr. Den møblerede Fribolig for en Ugift med Varme og Lys, som er indrettet for dem i hver af Forstanderboligerne, benyttes for Tiden af 2 extraordinære Assisterter. Fra 1. April d. A. ere alle Assistenters Gage forhøjede med 15 Procent.

Fra 1881 har hver af Afdelingerne haft sin faste Karl, der for Tiden lønnes med 1100 Kr. samt Fribolig med Varme og Lys,

fra 1896 har Laboratoriet havt en Varmemester, der nu lønnes med 1400 Kr. aarlig. Alle 3 have Adgang til Bryggeriets Pensionskasser, og Laboratoriet afholder Udgifterne derved.

Laboratoriets Virksomhed.

Den videnskabelige Virksomhed, Laboratoriet har udfoldet i de forløbne 25 Aar, finder hovedsagelig og klarest sit Udtryk i de Arbejder, dets Forstandere og Assistenten have offentliggjort i Laboratoriets Tidsskrift. Dette planlagdes meget tidligt. I Henhold til den smukke Bestemmelse i Statutterne: »Intet Resultat af Institutets Virksomhed, som har Betydning i theoretisk eller praktisk Henseende, maa hemmeligholdes«, vedtog Bestyrelsen allerede i 1877, at de i Laboratoriet udførte Undersøgelser skulde offentliggøres i et eget Tidsskrift, der skulde bære Navnet »Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet« og udkomme i tvangfri Hefter. Sproget skulde være dansk, men hvert Hefte tillige indeholde en fransk Résumé. Det første Hefte udkom i Juli 1878. I Begyndelsen af 1901 udkom 5. Binds 1. Hefte. Fra 1. Binds 4. Hefte er Résuméén ogsaa udkommet som særskilt Hefte. Fra og med 5. Binds 1. Hefte er Résuméén bortfaldet, men Tidsskriftet udkommer baade i en dansk og i en ligelydende fransk Udgave. Oplaget var indtil 1898 550 Exemplarer af det samlede Hefte og 100 Exemplarer af Résuméén, nu er det 750 Exemplarer af begge Udgaver. Skjøndt omtrent 250 Exemplarer uddeles til videnskabelige og tekniske Institutioner og til Videnskabsmænd og Zymoteknikere i Ind- og Udland, har Afsetningen dog været saa stor, at det har været nødvendigt i de sidste Aar at lade adskillige af de ældre Hefter optrykke paany.

Følgende Oversigt over Indholdet af de af de enkelte Forstandere og Assistenten i Laboratoriet udførte Arbejder vil give et Indtryk af den betydelige og betydningsfulde Virksomhed, Laboratoriets Mænd have udfoldet i dets første 25 Aar.

OVERSIGT OVER ARBEJDER, UDFØRTE I CARLSBERG LABORATORIETS KEMISKE AFDELING 1876—1901.

JOHAN KJELDAHL.

1ste Række.

Kemiske Undersøgelser af Øl og Ølurt.

Herhen hører først tre samtidigt publicerede Arbejder i *C. L. Medd.* 1, 1—39 (1878) over

- I. Ølurts Drejningsevne for plansat Lys og dens Forandring under Gjæringen.
- II. Extraktbestemmelser.
- III. Vinaandsbestemmelser.

I den første af disse Meddelelser vises, at det ikke kan være en og samme Sukkerart, der under hele Gjæringstiden omdannes til Alkohol og Kulsyre; thi de Stoffer, som gjære bort i Begyndelsen, have en Drejningsevne, som ligger betydeligt under Maltosens, medens de, som forsvinde i Slutningen af Hovedgjæringen, omtrent stemme overens med denne Sukkerart i Drejningsevne. Og under Eftergjæringen synes det især at være endnu stærkere drejende Stoffer, der bortgjøres. — Gjæringsprocessen i Urt viser sig herved ikke at være nogen ganske simpel Proces.

I den anden Meddelelse gjøres der Rede for en systematisk Gjennemførelse af forskellige Extrakt-Bestemmelses-Methoder, særlig Ballings. Det viste sig herved, at det virkelige Indhold af Rørsukker i en Opløsning af en vis Vægtfylde er lidt større, end det angives i Ballings Tabeller. Ved Extraktbestemmelse i Øl og Urt fandtes Fejlen dog i det hele meget ringe, saaledes at der ikke saaes Grund til for den Sags Skyld at indføre Rettelser i disse Tabeller til deres Brug i Praxis. I mange Tilfælde vil dog den direkte Indtørring og Vejning af Extraktmængden være at foretrække. — Da, en Række Aar senere, Nordmanden Riber

forbedrede denne direkte Extrakt-Bestemmelses-Methode og dertil konstruerede et Vakuumsapparat, har Kjeldahl forbedret dette Apparat, som nu under Navn af det Riber-Kjeldahl'ske Vakuumsapparat benyttes i kemisk-fysiologiske Laboratorier; en trykt Meddelelse herom har Kjeldahl dog ikke givet.

Det tredie af ovennævnte Arbejder indeholder Bidrag til den empiriske Kritik af de Formler, som benyttes til Beregningen af Alkoholmængden i Øl o. lign., og giver en Række Analyser af Alkohol- og Extrakt-Indhold m. m. i forskellige danske og her i Landet almindelig benyttede udenlandske Ølsorter.

IV. Om Cholin som Bestanddel af Øl. *C. L. Medd. 3*, 79—80 (1891). Heri paavises Forekomst af Cholin i Øl og Urt, og det godtgjøres, at dette Stof ikke blot skrives sig fra Humlen, hvori andre Forskere havde paavist Cholin, men at det især maa komme fra Maltet. Cholinet findes dels frit, dels i bunden Tilstand, vistnok som Lecithin, i Alt i en Mængde, der svarer til $\frac{1}{2}$ Procent af Øletrakten, saaledes at en Liter Lagerøl omtrent indeholder samme Mængde Cholin som et Hønsæg.

2den Række.

Studier over sukkerdannende Fermenter.

- I. Undersøgelser over sukkerdannende Fermenter. *C. L. Medd. 1*, 107—184 (1879).
- II. Nogle Iagttagelser over Invertin. *C. L. Medd. 1*, 331—338 (1881).

Navnlig den første af disse Afhandlinger har havt grundlæggende Betydning for Læren om Fermenternes Virkemaade og Betingelserne for deres Virksomhed. Denne Afhandling, der vedrører Diastase (Amylase) og Ptyalin, behandler nemlig følgende Spørgsmaal, som hidtil kun i meget ringe Grad havde været Gjenstand for Undersøgelse:

Diastasemængdens Indflydelse paa Sukkerdannelsen;
Temperatures Indflydelse paa Sukkerdannelsen;
Indflydelsen af Reaktionens Varighed;
Maaling af Fermentevne;
Koncentrationens Indflydelse paa Sukkerdannelsen og
Fremmede Stoffers Indflydelse.

Først de allerseneste Aars Forskning (Tamann, Duclaux, Hill o. a.) have i væsentlig Grad udvidet de Synspunkter, der vandtes ved disse Arbejder, som fremdeles danne et vigtigt Fun-

dament for Studierne paa hele dette Omraade. En nærmere Redegjørelse for Afhandlingernes specielle Indhold vilde her føre for vidt.

3die Række.

Forbedrede Methoder til Elementæranalyse.

I. En ny Methode til Kvælstofbestemmelse i organiske Stoffer. *C. L. Medd. 2*, S. 1—27 (1883). *Zeitschrift für analytische Chemie 22*, S. 366—382.

Denne Methode, hvis Hovedprincip er Behandlingen af det paagjældende Stof med koncentreret Svovlsyre under Opvarmning, har ganske fortrængt den Will-Varrentrap'ske Natronkalk-Methode, som den langt overgaaer med Hensyn til Udførelsens Letthed og i mange Tilfælde ogsaa med Hensyn til Nøjagtighed. Den gennemgribende Betydning, som Kjeldahls Methode har faaet, særlig for fysiologiske og tekniske Undersøgelser, anerkendes fra alle Sider; ved Asboths, Jodlbauers, Willfarths og Andres Forbedringer har Metoden i Aarenes Løb yderligere vundet i Anvendelighed. Den Forbedring af den jodometriske Syre-Titrering, som Kjeldahl indførte (*C. L. Medd. 2*, S. 323—329 [1888]) og det af ham konstruerede Destillerapparat (smst. S. 330—331) have fundet Anvendelse paa mange Laboratorier, men dog langt fra overalt.

II. Ogsaa paa Kulstofsbestemmelsens Omraade har Kjeldahl arbejdet; han foreslaaer, som i sin Tid Brunner, og senere Messinger, Anvendelse af Kaliumdichromat og Svovlsyre, samt Benyttelse af Kvægsølvteilde, anbragt i et ophedet Glasrør, som Middel til Iltningens Fuldstændiggjørelse. Disse Kjeldahl'ske Modifikationer af Kulstofbestemmelsen byde visse Fordele, men have dog ikke fundet almindelig Anvendelse (*C. L. Medd. 3*, S. 110—121 [1891]).

4de Række.

Studier over Æggehvidestoffer og deres Omdannelse.

Allerede i 1880 paabegyndte Kjeldahl slige Studier; just derved fremkom der Trang til en let udførlig Kvælstofbestemmelsesmethode. Ved Undersøgelser over Byggets Spiring, Mæskningsprocessen og Gjæringen blev der paavist eller dog sandsynliggjort proteolytiske Fermenters Medvirkning ved Stofomdannelserne under disse Processer. Disse Studier blev dog ikke afsluttede, men have dannet et af Udgangspunkterne for de senere paa Laboratoriet udførte Undersøgelser over Peptase o. l. (sml. nedenfor

S. 32: Weis). — Plante-Æggehvidestoffernes optiske Drejnings-evne og Opløselighedsforhold, særligt i Vinaand af forskjellig Styrke var endvidere Gjenstand for Kjeldahls Undersøgelser i en Række Aar. I de nævnte fysisk-kemiske Forhold fandtes flere gode Holdepunkter for Karakteriseringen af de for de enkelte Kornsorter ejendommelige Æggehvidestoffer, og, ganske modsat Ritthausens Angivelser, der synes at bero paa Sønderdelingsprocesser under Analyserne, finder Kjeldahl, at Hovedmængden af de forskjellige, nærmere prøvede Kornsorters Proteinstoffer er et for hver Art særligt, enkelt Æggehvidestof. Om disse Forhold har Kjeldahl kun givet en foreløbig Meddelelse paa det skandinaviske Naturforskermøde i Kjøbenhavn 1892 (aftrykt i *C. L. Medd.* 5, xii—xv). I sine sidste Aar har Kjeldahl levende interesseret sig for Hexonbasernes Forhold til Æggehvidestofferne, men ikke efterladt sig anvendelige Optegnelser.

5te Række.

Studier over Kulhydraternes Forekomst og deres kvantitative Bestemmelse.

Med Hensyn til det sidste af disse Momenter, indeholder den ene af Afhandlingerne om sukkerdannende Fermenter (*C. L. Medd.* 1, 116 ff. [1879]) Redegjørelse for nogle Forbedringer af Sukker-Bestemmelses-Metoden med Fehlings Vædske. Særlig skildres en meget praktisk Ændring af Reischauers Modifikation af Sukkertitreringen. Senere opgaves dog Titreringen som ikke tilstrækkelig exakt, og ved at anvende Vægtbestemmelser af det ved Reduktionen vundne Kobberforilte, resp. Kobber, opdagedes en hidtil ganske overset Fejlkilde ved Kobbervædske-Metoderne, nemlig Iltens lettere eller vanskeligere Adgang til Vædsken under Reduktionsprocessen (Undersøgelser over Sukkerarternes Forhold mod alkaliske Kobberopløsninger, *C. L. Medd.* 4, 1—62 [1895]). Denne Opdagelse medførte den meget væsentlige Ændring af Metoden, at Opvarmningen af Sukkeropløsningen med Kobbervædsken udføres i en Brintstrøm. Kun derved opnaaes konstante Resultater, medens disse ellers vare forskjellige ved Benyttelsen af i forskjellig Grad aabne Kogekar. Den nye Methode nødvendiggjorde Udarbejdelsen af nye Tabeller over Forholdet mellem udskilt Kobberforilte og Sukkermængde. For rene Sukkerarter, behandlede hver for sig, findes slige Tabeller i den nævnte Afhandling. (Om Sukkerblandinger se nedenfor S. 32: Jessen-Hansen). Ogsaa til Forstaaelsen af selve Reaktionen i

Kobbervædsken har Kjeldahl givet Bidrag; i den nævnte Afhandling paavises Dannelsen af en betydelig Mængde Mesoxalsyre ved Behandling af Glykose med Soldainis Vædske.

Studiet af sukkerdannende Fermenter førte ogsaa Kjeldahl ind paa Undersøgelser af Kulhydraternes Forekomst og Omdannelser i Planterne. Undersøgelser over Kulhydrater i Byg og Malt, med særligt Hensyn til Forekomsten af Rørsukker (*C. L. Medd.* 1, 339—379 [1881]) er en Frugt heraf. Heri paavises et nyt Polysaccharid i Byg, nemlig det omtrent samtidigt i ren Tilstand af O'Sullivan fremstillede Amylan, samt det vigtige Forhold, at Rørsukker dannes i betydelig Mængde under Byggets Spiring, og at Rørsukkeret inverteres. Netop denne Inversion kan, hvis ikke særlige Forsigtighedsregler tages, ganske skjule Rørsukkerets Tilstedeværelse: Udredelsen af disse Forhold har haft betydelig Interesse for den plantefysiologiske Forskning; den af Kjeldahl anbefalede Behandling af levende Plantedele, der skulle analyseres, nemlig Knusning med Baryumkarbonat under Tilsætning af stærk Alkohol og paafølgende Ophedning, betegner et betydeligt Fremskridt i methodisk Henseende. I den paagjældende Afhandling gjøres der endvidere Rede for Forsøg til en samtidig Bestemmelse af forskellige Sukkerarter.

W. JOHANNSEN

har, dels under sin Ansættelse som Assistent (1881—1887), dels senere lejlighedsvis som Gjæst (1890—94) arbejdet i Laboratoriets kemiske Afdeling. Følgende Arbejder ere udførte eller paabegyndte her.

I. Om Frøhviden og dens Udvikling hos Byg. Med 3 Tavler. *C. L. Medd.* 2, 103—133 (1884).

I denne Afhandling følges Frøhvidens Udvikling; og den modne Frøhvides Bygning, særligt de saakaldte Fermentcellers finere Beskaffenhed, behandles nærmere. Endvidere gjøres der Rede for den umiddelbare Aarsag til Glassethed og Melethed hos Byg og Hvede; ved Hjælp af en ny særlig Skjæremethode paavises nemlig tidligere Forskeres Fejltagelser med Hensyn til Forekomst og Fordeling af Luft i Frøhviden. Kun i melede Frøhvideceller findes der Luft, som ligger i det indtørrede Cytoplasma.

II. Om Varmens Indflydelse paa nogle Kimplanter
Kulsyre-Udvikling og Sukkerdannelse. Offentliggjort, i
Sammenhæng med i Tübingen udførte Undersøgelser over høje Ilt-
trykks Indflydelse, i: *Untersuchungen aus dem bot. Inst. Tübingen*,
1, 708—713 (1885).

Ved disse Forsøg viste det sig, at høje, dog endnu ikke
dræbende Temperaturer som Eftervirkning medførte en betydelig
Nedgang i Aandedrættets Livlighed, endskjønt Sukkermængden
blev kjendelig forøget ved Varmens Indflydelse. Den oftere hæv-
dede Parallelisme mellem Sukkerrigdom og Aandedræt er altsaa
ikke tilstede.

III. Bemærkninger om melet og glasset Byg. *Ugeskrift
f. Landmænd*, 1887, 2, S. 207 og *Die landw. Versuchs-Stationen*,
35, 19—23 (1888).

I disse foreløbige Meddelelser paavises ved tabellariske Sam-
menstillinger af egne Analyser, at Byggets procentiske Kvælstof-
Indhold har overvejende Betydning for Kornets Evne til i moden
Tilstand — under passende Fugtighedsforhold, f. Ex. kortvarig
Udblødning — at blive »melet«; jo fattigere paa Kvælstof Bygget
er, desto mere melet kan det blive. Der peges tillige paa den
forstyrrende Indflydelse, som Bygprøvernes større eller mindre
Uensartethed kan have paa disse Forhold.

IV. Om Amygdalinets og Emulsinet's Plads i Mand-
lerne. *Botanisk Tidsskrift*, **16**, 222—229 (1888) og *Annales des
sciences nat. Bot.* 7^e série, **6**, 118—126 (1888).

Heri paavises det, at Emulsinet og Amygdalinet ere lokali-
serede i forskjellige Væv, hvad der er Grunden til, at de ikke
paavirke hinanden i det levende Frø. Emulsinet findes i eller
ved Karstrængene og i Kimens Axeorganer; Amygdalinet, hos
bittre Mandler, i Kimbladenes Parenchymceller. Guignard har
senere ved mikrokemiske Metoder bekræftet og nøjere præciseret
disse Resultater, hvad de histologiske Detailler angaaer.

V. Om Gluten og dets Plads i Hvedekornet. *C. L.
Medd.* **2**, 332—356 (1888).

I denne Afhandling paavises, at Bischoff & Weyls Anta-
gelse, at Gluten først dannes ved Indvirkning af et særligt Ferment,
er ubegrundet; alle Egenskaber ved Melet, der kunde betragtes
som Støtte for denne Antagelse, gjenfindes nemlig hos Mel, frem-
stillet ved at ælte frisk Gluten med Stivelse og derpaa tørre og
pulverisere Massen. Endvidere paavises det, at Fermentcellerne

(de fejlagtig saakaldte »Glutenceller«) ikke er Sædet for Glutenet, som derimod findes mellem Stivelsekornene.

VI. Om Aandedrættets formentlige Fortsættelse efter Døden. *Botanische Zeitung*, 45. Jahrg. S. 762—763 (1887).

Støttet til en Række Undersøgelser, udførte paa Carlsberg Laboratoriet i 1886 og 1887 tilbageviser Forf. Reinkes Antagelse af et postmortalt Aandedræt. Forholdet er dette: Ved Døden standser Aandedrættet helt; men lidt efter lidt sker en stedse livligere Kulsyre-Udskilning, som viser et andet Forhold overfor Iltmangel end den levende Plantes, og som dels kan skyldes Mikroorganismer, dels Sammenblanding af Stoffer, der i den levende Plante holdes adskilte.

VII. Om Variabiliteten med særligt Hensyn til Forholdet mellem Kornvægt og Kvælstof-Procent hos Byg. *C. L. Medd.* 4, 228—313 (1898).

De paagældende Undersøgelser paabegyndtes paa Carlsberg Laboratorium 1893 og fortsattes fra 1895 paa Landbohøjskolens plantefysiologiske Laboratorium. Afhandlingen giver, foruden en Redegjørelse for Hovedpunkterne af Læren om Korrelation og korrelativ Variabilitet, en Oversigt over 5 Aars Forsøgs-Afgrøder af Goldthorpe-Byg, med Hensyn til Ax-Længde, Axenes Korn-Antal, Kornvægt og Kvælstof-Procenten hos Korn af en Række forskellige Ax. Særlig belyses Forholdet mellem Kornvægt og Kvælstof-Procent med det Formaal at give en kritisk Vurdering af den særlig af Schindler og Proskowetz fremsatte Lære om »Uforenelighed af værdifulde Egenskaber«. Afhandlingens Hovedresultater ere: 1) Der findes en uventet stor individuel Variation med Hensyn til Kvælstof-Procenten hos Korn af modne, fuldt udviklede Ax. 2) Bygkornenes Kvælstof-Procent i forskellige Ax af samme Plante vise gennemgaaende ret stor Overensstemmelse, dog sees ikke sjelden ret stor Variation. 3) I Forholdet mellem Kornvægt og Kvælstof-Procent findes ingen fast Lovmæssighed, hvad det enkelte Individ angaaer. I Gjennemsnit ville de store Korn være de kvælstofrigeste. 4) Ved et gennem tre Generationer foretaget Udvalg af storkornede Ax med lav Kvælstof-Procent er der i 4de Generation vundet et »Undtagelses-Afkom«, der viser en Forskydning med Hensyn til den nys nævnte Gjennemsnitsregel. 5) Schindler & Proskowetz' Opfattelse af Korrelationernes Betydning maa modificeres væsentligt. —

Det fortjener fremdeles at bemærkes, at de allerfleste af de Byg-Analyser, som findes sammenstillede i det kgl. Landhushold-

ningsselskabs Maltbyg-Udvalgs Redegjørelse (*Tidsskr. for Land-økonomi* 5. Række **12**, 513—579 [1893]) ere udførte paa Carlsberg Laboratoriet, dels og især af W. Johannsen, dels af R. Koefoed.

R. KOEFOED.

Nogle Iagttagelser over Cholin og dets Homologe.
C. L. Medd. **3**, 88—109 (1891).

Forsøgene foretoges væsentligt med analytiske Formaal for Øje. Adskilligt tyder nemlig paa, at der i Naturen sammen med det saa almindeligt forekommende Cholin findes analoge — muligt homologe — Forbindelser, til hvis Paavisning og Individualisering der dog mangler Metoder.

Undersøgelserne omfatte forskellige Reagensers Forhold overfor Cholin (fremstillet enten af naturligt forekommende cholinholdige Stoffer eller ad syntetisk Vej) og nogle nærstaaende Forbindelser, nemlig Æthyltrimethylammoniumhydrat, Isopropyltrimethylammoniumhydrat og dets Oxybase — disse tre sidste fremstilledes syntetisk.

Afhandlingen, der har en noget fragmentarisk Karakter, fordi Arbejdet pludseligt maatte afbrydes, indeholder — ved Siden af en Redegjørelse for Fremstillingsmetoderne — Beskrivelse af en Del Forbindelser af de nævnte fire Baser, nemlig Dobbeltsalte med Platinchlorid, Guldchlorid, Kvægsølvchlorid, Kvægsølvjodid samt Polyjodider, desuden Dobbeltsalte af Cholin med Cadmiumchlorid, Zinkchlorid, Platinbromid og Guldbromid.

H. JESSEN-HANSEN.

I. Studier over de i Rug, Byg og Hvede paa forskellige Udviklingstrin forekommende Kulhydrater.
C. L. Medd. **4**, 145—192 (1896).

Udviklingen af de nævnte Kornsorters Frugter følges med Hensyn til Art og Mængde af de optrædende Kulhydrater. Af Kulhydrater, opløselige i fortyndet Vinaand, fandtes, foruden Invert- og Rørsukker samt det af E. Schulze fundne Secalose, det — allerede af Tanret paaviste — Stof, hvis væsentlige Kjendetegn er, at det i Vand fældes af Baryt og ved Syre-Inversion kun giver Fructose. Desuden godtgjøres Tilstedeværelsen af et eller flere ukjendte Stoffer, hvis Isolering ikke lykkedes. Det

samlede procentiske Indhold af i Vinaand opløselige Kulhydrater aftager jævnt fra ca. 30 à 40 Procent af Tørstoffet under det første undersøgte Udviklingstrin til ca. 2 à 4 Procent henimod Modningens Afslutning. Den absolute Mængde er derimod langt mindre foranderlig. — Ved Stivelsebestemmelser viste Bygget et afvigende Forhold, idet Stivelsemængden aftog procentisk i den sidste Udviklingsfase; absolut set tiltog dog Stivelsemængden ogsaa hos Byg, ganske som hos de andre Kornsorter. Mængden af Pentosaner fandtes procentvis temmelig konstant.

II. Om Bestemmelsen af Invertsukker ved Siden af Rørsukker. *C. L. Medd.* 4, 314—326 (1899).

Den paagjældende Undersøgelse er en Fortsættelse af Kjeldahls Arbejde over Sukkerarternes Forhold mod Kobberopløsninger (sml. ovenfor S. 27). Arbejdsmaaden tilpasses saaledes, at Metoden bliver brugelig i det i Titlen angivne Øjemed. Afhandlingen slutter med en Tabel, der viser hvor meget Invertsukker der, under nærmere angivne Forhold, svarer til en funden Mængde Kobber.

FR. WEIS.

Undersøgelser over Peptase. *Zeitschrift für physiologische Chemie* 31, 79—97 (1900).

Heri konstateres, i Tilslutning til Kjeldahls ældre Erfaringer, Forekomst af Peptase i Grøn malt og Køllemalt. Dette Ferments Virkninger förfølges, dels ved at lade vandige Udtræk virke paa Hvedeglutin, dels ved Mæskningsforsøg, og Fermentvirkningens Afhængighed af Temperaturen, Tiden, Syrer, Koncentrationen og andre Forhold prøves nærmere, ligesom ogsaa Spiringsstadiets Indflydelse. Det paavises endvidere, at Peptasen virker kraftigt under Brygningsprocessen, hvorved den i høj Grad bliver bestemmende for Urtens (resp. Øllets) Indhold af kvælstofholdige Stoffer. Endelig paavises der Forekomst af et »Løbeferment« i Grøn malt.

OVERSIGT OVER ARBEJDER, UFFØRTE I CARLSBERG LABORATORIETS FYSIOLOGISKE AFDELING 1876—1901.

RASMUS PEDERSEN.

I. Undersøgelser over de Faktorer, der have Indflydelse paa Formeringen af Undergjærformen af *Saccharomyces cerevisiæ*. *C. L. Medd.* 1, 40—71 (1878).

Efter en historisk Indledning omtales først Varmens Indflydelse paa Gjærcellernes Formering. De forskjellige Methoder til Bestemmelse af Gjærmængden drøftes. En Tælningsmethode som den af Medicinerne til Bestemmelse af Blodlegemernes Antal anvendte, viser sig at være den nøjagtigste, hvorfor den benyttes. Methodens Fejlgrændser bestemmes. Til Tilvejebringelse af konstante Temperaturer benyttes Panums Thermostat, som afbildes og beskrives. Forsøgene foretages med almindelig Bryggeri-Undergjær, der er rensat ved Slemning, og til Næringsvædske benyttes ikke humlet Urt. Hovedresultatet opsummeres saaledes: »Temperaturen har vel Indflydelse paa den Hastighed, hvormed Gjærcellerne formere sig, men den har ingen Indflydelse paa det Antal Gjærceller, der i det Hele taget dannes i en Næringsvædske af den givne Beskaffenhed.«

Der meddeles dernæst et Par foreløbige Forsøg over den Indflydelse, Næringsvædskens Koncentration udøver paa Gjærcellernes Formering.

II. Forsøg over den Indflydelse, som Indledning af atmosfærisk Luft i gjærende Urt under Gjæringen udøver. *C. L. Medd.* 1, 72—86 (1878).

Først meddeles Resultatet af tidligere Forskeres Undersøgelser, derpaa Forf.'s egne Forsøg. Hovedresultatet af disse blev: Naar Urten luftes under Gjæringen, 1) avles der en større Mængde Gjær, og Gjæringen bliver hurtigere og fuldstændigere,

2) er den Mængde Tørstof, som en Vægtedel Gjær har omdannet til flygtige Stoffer, mindre, end naar Urten ikke luftes under Gjæringen.

III. Undersøgelser over Varmegradens Indflydelse paa Udskilningen af Kulsyre hos Byg-Kimplanter i Mørke. (Foreløbig Meddelelse.) *C. L. Medd.* **1**, 86—105 (1878).

Efter en Oversigt over tidligere Undersøgelser beskrives bl. a. det ved de nærværende Forsøg anvendte Respirationsapparat. Resultatet af Forf.'s Undersøgelser blev, »at Kulsyreudskilningens Temperatur-Maximum og Temperatur-Optimum, hvis et saadant eksisterer, hos Byg-Kimplanter ikke ligger lavere end $33,5^{\circ}$, og at den laveste Temperatur, ved hvilken Byg-Kimplanter kunne udskille Kulsyre, ligger under 0° .«

EMIL CHR. HANSEN.

1ste Række.

Organismer i Øl og Ølurt.

Bidrag til Kundskab om, hvilke Organismer der kunne forekomme og leve i Øl og Ølurt. *C. L. Medd.* **1**, 209—274 (1879).

Heri omhandles særlig Undersøgelser over hindedannende Arter, *Oidium lactis*, rødfarvede Gjærsvampe og gjærsvampelignende Celler, og der gives en Beskrivelse af de i de nævnte Nærings-substrater iagttagne Organismer med morfologiske Undersøgelser. Nye Arter opstilles.

Endvidere meddeles experimental-fysiologiske Forsøg, nemlig over Horvaths Hypothese og over den Indflydelse, som Indledning af atmosfærisk Luft i gjærende Urt under Gjæringen udøver. De to følgende Rækker om Eddikesyrebakterier og om Luftens Mikroorganismer tage deres Udspring umiddelbart fra den nærværende, og til 4de og 5te Række findes flere Forstudier deri.

2den Række.

Eddikesyrebakterier.

I. *Mycoderma aceti* (Kütz.) Pasteur og *Mycoderma Pasteurianum* nov. sp. *C. L. Medd.* **1**, 275—281 (1879).

Det paavises, at det ikke er een, men flere Arter af Bakterier, som fremkalde Eddikesyregjæringen. En vigtig Karakter

findes i Reaktionen overfor Jodopløsninger (blaa Farvning). Der leveres experimentelle Beviser for, at samme Art kan optræde med en hel Række meget forskellige Former.

II. Undersøgelser over Eddikesyrebakterier (2den Afhandling). *C. L. Medd.* 3, 265—327 (1894).

Heri paavises, at de korte Celler, som danne de hos disse Arter saa karakteristiske Kjæder, holdes sammen af en Slimindhylning. Om denne vises blandt andet, at det er den, der giver den blaa Reaktion med visse Jodopløsninger, hvorved den af Hansen opstillede Gruppe af nye Arter udmærker sig. Der gjøres derpaa Rede for de Betingelser, som fremkalde den berørte Formomdannelse, særlig paavises det, hvorledes Temperaturen optræder som formdannende Faktor. Ved Temperaturer omkring Optimum træder Kjædeformen med sine korte Led frem i sin kraftige Udvikling og typiske Skikkelse; nær Maximum udvikles derimod meget lange Traade. Overføres disse Traade ved Optimum, dele de sig i korte Led, saa man atter vender tilbage til Kjædeformen. Disse Udviklingsfænomener fandtes i Hovedtrækkene hos alle Arter, der blev prøvede; der gjør sig altsaa her en Lovmæssighed gjældende. I samme Afhandling behandles Eddikebakteriernes Forhold i Ølfabrikationen, Arternes Systematik og Variationsfænomener i forskellig Retning; Livsgrænsen under forskellige Forhold bestemmes, og der angives Metoder til Opbevaring af Arterne i levende Tilstand i lang Tid.

III. Undersøgelser over Eddikesyrebakterier (3die Afhandling). *C. L. Medd.* 5, 36—43 (1900).

Heri findes nye Undersøgelser over Variationsfænomenerne, Livsgrænsen og en ny Methode til Opbevaring.

3die Række.

Luftens Mikroorganismer.

Undersøgelser over de Organismer, der til forskellige Tider af Aaret findes i Luften i og omkring Carlsberg, og som kunne udvikle sig i Ølurt. *C. L. Medd.* 1, 185—209 (1879) og 381—454 (1882).

Der gives Oplysning om Arterne, om deres Opfostringssteder og den Forskjel, der er i deres Optræden efter Aarets Tider saavel inde i Bryggeri-Lokalerne som i det Frie.

Den sidste af disse Afhandlinger har en særlig Betydning derved, at der i den blev meddelt en exakt Methode til

Fremstilling af en ren Massekultur af Gjær, som den fysiologiske Undersøgelse kræver det; ligeledes for første Gang en Experimentalundersøgelse over Sygdomme i Øl, fremkaldte ved Indvirkning af vild Gjær, og paa Grundlag heraf en ny Methode til Analyse af Bryggerigjær. Disse Undersøgelser blev udførte i Løbet af Aarene 1880 og 1881, og derved blev de nye Baner aabnede for de i de følgende Rækker omtalte Undersøgelser og Opdagelser.

4de Række.

Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.

I. Om *Saccharomyces apiculatus* og dens Kredsløb i den frie Natur. *C. L. Medd. 1*, 293—327 (1881).

Det lykkedes her for første Gang at forfølge Spørgsmaalet om en Mikroorganismes normale Opfostrings- og Overvintringssted og om dens Kredsløb i den frie Natur. Forsøgene viste forøvrigt, at dette ikke behøver at fuldendes i Løbet af 1 Aar, Cellerne kunne nemlig bevare deres Liv i over 3 Aar i Jorden.

I morfologisk Henseende blev det paavist, at denne Art afsnører to Slags Knopper, og Reglen for disses indbyrdes Forhold og Udvikling blev angivet.

Den fysiologiske Undersøgelse fik en mere almen Betydning derved, at man derigjennem fik Øje for, at Gjærarterne forholde sig forskjellig overfor Sukkerarterne. *Sacch. apiculatus* viste sig saaledes hverken at forgjære Saccharose eller Maltose.

Det er fremdeles den eneste Mikroorganisme, hvis Kredsløb i Naturen er oplyst. Paa Grund af Artens karakteristiske Form lod Undersøgelsen sig udføre med Sikkerhed og med forholdsvis ringe Møje. Ogsaa i anden Henseende var det et lykkeligt Greb, der blev gjort ved Forsøgene med denne Gjærart; thi herved kastedes der tillige Lys paa de øvrige Alkoholgjærsvampes og Exo-asceernes Kredsløb. I foreløbige Meddelelser gav Hansen selv Oplysninger i den Retning (navnlig i *Ann. des sciences naturelles* 1890), og Undersøgelserne blev fortsatte af hans Efterfølgere.

II. Om Askosporedannelsen hos Slægten *Saccharomyces*. *C. L. Medd. 2*, 29—86 (1883).

I denne Afhandling skete Gjennembruddet helt, og Grundlinierne for den senere biologiske Forskning over *Saccharomyceterne* blev dragne.

Den af Hansen, som ovenfor berørt, i 1881 fundne nye Rendyrkningsmethode bliver i nærværende Afhandling nærmere beskrevet. Det er en Fortyndingsmethode, beroende paa den Iagttagelse, at man ved at udryste et vist Antal Gjærceller i en Kolbe med Næringsvædske vil faa et tilsvarende Antal Gjærpletter paa Kolbens Bund. De Kolber, i hvilke kun een Gjærplet udvikler sig, indeholde Renkulturer.

Denne Methode satte ham i Stand til at adskille de sikre Enheder, og hermed var Banen aabnet for den experimentale Forskning over Saccharomyceterne. Hidtil havde man foretaget Undersøgelserne med ukjendte Blandinger. De paa den Tid opstillede Arter viste sig at være uholdbare; de bleve kløvede i flere, og Karakterer udfundne efter nye Synspunkter, særlig den forskjellige Maade, hvorpaa Vegetationerne reagere overfor ydre Faktorer; herved blev Undersøgelsen af Arterne tillige Bidrag til Gjærsvampenes almindelige Biologi. I denne Afhandling gives navnlig Oplysninger om Sporedannelsens og Knopskydningens Forhold til Temperaturen (Temperaturkurverne for Sporedannelsen hos 6 Arter bestemmes), om de vigtigste Betingelser for Sporedannelsen og om den til Sporedyrkningen hørende Teknik.

III. Om Pasteurs *Torula*. *C. L. Medd.* 2, 87—92 (1883).

Da Undersøgelserne i nærværende Række efter Planen ikke blot skulde omfatte Saccharomyceter, men Alkoholgjærsvampe i videste Forstand, inddrages nu efterhaanden et stort Antal Arter, henhørende til forskellige Afdelinger i Systemet. *Torula*-Arternes Forhold til Sukkerarterne belyses; store Differenser og mange Kombinationer iagttages i den Henseende.

IV. Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe. *C. L. Medd.* 2, 93—102 (1883).

Heri omhandles den Sygdom i undergjæret Øl, som kaldes Gjærtykhed. Resultaterne omtales i 5te Række.

V. Metoder til Fremstilling af Renkulturer af Saccharomyceter og lignende Mikroorganismer. *C. L. Medd.* 2, 152—167 (1886).

Som ovenfor meddelt, fremstillede Hansen sin første Renkultur i Vædske ved Hjælp af en Fortyndingsmethode. Lidt senere gik Koch ved sin Gelatinemethode ud fra det samme Princip som Hansen, idet han betragter de efter vedkommende Mikroorganismers Spredning i Næringsgelatinen fremkomne Vegetations-Pletter som Renkulturer. Anvendelsen af Gelatine gør

Arbejdet meget lettere og betegner et vigtigt Fremskridt, men ved at anvende Gelatinen paa den Maade, som Koch gjør, bliver Sikkerheden mindre end i Hansens Methode. I nærværende Afhandling vises, hvorledes denne Mangel kan afhjælpes. Gelatine-metoden bliver herved til Encellekultur paa Mikroskopbordet. Denne Rendyrknings Teknik beskrives.

VI. Om Hindedannelsen hos Slægten *Saccharomyces*. *C. L. Medd.* 2, 168—210 (1886).

Heri Undersøgelser over de almindelige Betingelser for denne Udvikling og for Fremkomsten af de forskellige Former, som Cellen derved antager. Endvidere paavises, hvorledes Hindedannelsen kan tjene til Karakterisering af Arterne og derved indgaa som Led i Analysen. Til Slutning forskellige mindre Undersøgelser, navnlig over Cellekjernen og den i en foreløbig Meddelelse i 1885 hos Gjærcellerne paaviste gelatinøse Dannelse. Om Forholdet mellem Over- og Undergjær gives Oplysninger.

VII. Om Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne. *C. L. Medd.* 2, 220—256 (1888).

Fortsættelse af de i det foregaaende berørte Undersøgelser over det nævnte Emne. Der blev arbejdet med 40 Arter (*Saccharomyces*, *Mycoderma*, *Torula*, *Monilia*, *Mucor*, *Oidium*). I Afhandlingen paavises, at der indenfor enhver af de nævnte systematiske Afdelinger findes en Rigdom af fysiologiske Kombinationer. Heri traadte aldeles konstante Forhold frem, som ogsaa bragte nye, fortrinlige Karakterer til at skjelne mellem Arterne. Der beskrives et Par nye, meget karakteristiske *Saccharomyces*-Arter, hvoraf den ene udmærker sig ved sin Myceliedannelse, medens den anden adskiller sig fra alle andre hidtil iagttagne ved, at den hverken fremkalder Alkoholdannelse eller Invertering af Rørsukker.

VIII. Om Sporernes Spiring hos *Saccharomyceterne*. *C. L. Medd.* 3, 53—78 (1891).

Dette Fænomen var hidtil kun undersøgt efter en mangelfuld Methode. Man antog, at Spiringen foregik paa samme Maade hos alle Arter. I Modsætning til sine Forgjængere forfulgte Hansen direkte paa Mikroskopbordet alle Udviklings-Stadierne med Udgangspunkt fra den enkelte Spore. Herved fremdroges og belystes nye morfologiske Forhold, særlig Sammenvoxningsfænomener, og hos *Sacch. Ludwigii* blev der gjort den Iagttagelse, at de Gjærceller, som komme frem ved Sporens Spiring, ikke som hos de andre *Saccharomyceter* udvikles direkte fra Sporen selv, men fra et Promycel.

IX. Om Alkoholgjærsvampenes Livsgrændse. *C. L. Medd.* 4, 198—227 (1898).

Da der var skabt sikre Methoder til Fremstilling af absolute Renkulturer, fik Spørgsmaalet om Arternes Opbevaring i levende Tilstand en særlig Interesse. Hansens første Undersøgelser i den Retning berøres i *C. L. Medd.* 1, 321 (1881); de ere senere blevne fortsatte, og smaa Meddelelser herom findes lejlighedsvis i flere af de foregaaende Afhandlinger; den nærværende indeholder en Op-gjørelse. Analyserne blev udførte med 42 Arter af ægte *Saccharomyces*, 5 sporeløse Varieteter af sidstnævnte, 7 *Mucor*-Arter og 9 andre Gjærsvampe.

Det lykkedes at finde en Methode, ved Hjælp af hvilken Cellerne i en lang Række af Aar kunne opbevares i levende Tilstand. Dette sker ved at anbringe en ringe Del af vedkommende Gjær i en Kolbe med Luftadgang og indeholdende en vandig 10 Procents Rørsukkeropløsning. Kun et Par af de prøvede 42 *Saccharomyces*-Arter viste nogen Uregelmæssighed, idet de i enkelte Kulturer døde efter 1 til 2 Aars Forløb; for de øvriges Vedkommende ligger Livsgrænsen under disse Omstændigheder meget fjern. Flere havde tilbragt over 17 Aar, da de sidst blev prøvede, og var fremdeles levende. Ogsaa for de andre ovennævnte Arter viste denne Methode sig at være fortrinlig.

Til Opbevaring af Gjærprøver i Laboratorierne anvendes nu i Almindelighed den nævnte *Saccharose*-Methode, til For-sendelse derimod den ligeledes af Hansen angivne Indtørnings-Methode paa Bomuld. Disse Methoder beskrives nærmere i Afhandlingen. Ved Hjælp af Indtørnings-Metoden ere Bryggerierne i Australien, Asien og Syd-Amerika bleve forsynede med Renkulturer af udvalgte Gjærracer fra Europa.

Det fandtes, at *Saccharomyceterne* ikke bevarede deres Liv saalænge i indtørret Tilstand, som naar de befandt sig i Rørsukkeropløsningen. Dette gjaldt derimod ikke om *Mucor*-Arterne og om visse *Pyrenomyceter*; en af de sidstnævnte holdt sig endog levende i over 21 Aar i indtørret Tilstand.

Nærværende Afhandling indeholder ogsaa Oplysninger om Alkoholgjærsvampenes Livsgrændse, naar de opbevares i Vand og i Jord. Disse Undersøgelser slutte sig herved til de i de foregaaende Afhandlinger omtalte Undersøgelser over *Saccharomyceternes* Kredsløb i Naturen.

X. Om Variationen hos *Saccharomyceterne*. *C. L. Medd.* 5, 1—35 (1900).

Iagttagelser over Variationen findes i alle de foregaaende Af-

handlinger. Indtil 1889 gik dog Undersøgelserne væsentligst ud paa at studere Saccharomyceterne fra det Synspunkt, at der hos dem ligesom hos andre Organismer findes systematiske Enheder med konstante Karakterer; derefter traadte experimentelle Studier over Variationen mere og mere i Forgrunden. I Aarene 1889, 1890, 1895, 1896 og 1897 gav Hansen i forskellige Tidsskrifter foreløbige Meddelelser herom. I nærværende Afhandling gives en Oversigt over disse Arbejder, og der knyttes hertil nye Undersøgelser og nye Afbildninger. Der meddeles Oplysninger om de Betingelser, under hvilke Cellens Form kan variere fra den ovale eller kuglerunde til den langtstrakt pølse-dannede og traadformede, hvorved en Myceldannelse kan opstaa. Det paavises, at der ved en vis Behandling fremkomme Varieteter, som have en stærkere Alkoholgjærings-evne end deres Stamformer; og atter ved en anden Behandling Varieteter, som gaa i den modsatte Retning. Herved er man f. Ex. i Stand til at fremstille nye Racer af Bryggerigjær med svagere Forgjæring og bedre Klaring end deres Stamform. Fælles for alle Variationsretninger er det, at der i en og samme Vegetation, som oprindelig stammer fra den samme Encellekultur, kan opstaa Individer, som kunne grundlægge forskellige Varieteter med en høj Grad af Konstans. Paa en iøjnefaldende Maade traadte dette frem ved Sacch. Ludwigii. Ved at isolere et større Antal af Cellerne fremkom tre Vegetationsformer, hvoraf den ene udmærkede sig ved sin kraftige Evne til Sporedannelse, medens denne hos den anden tvertimod var forsvindende, og hos den tredie slet ikke traadte frem. De to sidste holdt sig gennem talrige Generationer, men var dog ikke fuldstændigt fæstnede.

I 1889 gjorde Hansen imidlertid den Opdagelse, at Saccharomycescellerne fuldstændig miste Evnen til at danne Sporer, naar de gennem talrige Generationer dyrkes i Næringsvædske ved en Temperatur i Nærheden af Maximum for Knopskydning. Udgangspunktet for disse Forsøg var den af ham i tidligere Undersøgelser fundne Regel, at Temperaturmaximum for Knopskydningen hos Saccharomyceterne ligger nogle Grader højere end Temperaturmaximum for Sporedannelsen. Muligvis gjælder dette ikke blot for Saccharomyceterne, men for Svampene i Almindelighed.

Blandt de fremstillede Varieteter lade kun de sporeløse sig helt beherske; de vise de klareste Forhold og ere tillige de eneste, som vi for Øjeblikket kunne opfatte som konstante. Herved faae de en særlig Interesse i praktisk Henseende som

Udgangspunkter til Fremstilling af nye Racer til Brug i Industrien. Af disse Grunde blev Hovedvægten lagt paa Studiet af denne Variation. Analyserne blev fortrinsvis udførte med Sacch. Pastorianus I og Johannisberg II. Udgangspunktet var dels en vegetativ Celle, dels en Spore, som grundlagde Vegetationer med rig Sporedannelse. Paa de forskellige Stadier blev Gjennemsnitsprøver af flere Hundrede Individer isolerede, for, hver for sig, at underkastes Analyse. Hertil blev der udarbejdet en lettere Methode end den hidtil anvendte.

Naar man gennemgaaer Litteraturen om Variationen hos højere og lavere Planter, seer man, at der som Regel slet ikke stilles Spørgsmaal, om de beskrevne Dyrkningsforhold virkelig fremkalde en Omdannelse, eller om der kun er Tale om en Udvælgelse, og i de faa Tilfælde, i hvilke en Drøftelse foretages, ere Meningerne derom delte og Resultaterne usikre. I Almindelighed er Fremkomsten af de sporeløse Varieteter bleven opfattet som beroende paa en Udvælgelse, idet man har ment, at der i den Vegetation, hvormed Forsøget begyndte, har været en og anden Celle tilstede, som allerede var asporogen, og at det da er dens Afkom, som under Behandlingen ved den høje Temperatur efterhaanden har bredet sig fra Kultur til Kultur og trængt de sporegivende Kammerater tilbage.

En af Afhandlingens Hovedopgaver var at opklare dette fundamentale Spørgsmaal. Analysen af Udgangspunktets Vegetation som ogsaa Undersøgelsen af Fænomenets forskellige Sider gav det Resultat, at der foregaaer en Omdannelse. Der er i Cellernes Plasma under Behandlingen ved den høje Temperatur traadt en ny Kombination frem. I disse Analyser iagttoges det interessante Fænomen, at der under den beskrevne Behandling ogsaa opstaaer Celler, hvoraf hver enkelt udvikler et Afkom, i hvilket nogle Individer ere sporeløse, andre derimod kraftige Sporedannere, og atter andre staa imellem begge Yderpunkter, og at dette Forhold kan gjentage sig, saaledes at en sporegivende Celle af en ny Vegetation fremdeles giver Stødet til Dannelsen af de tre Kategorier.

Iblandt Betingelserne for Omdannelsen viser den høje Temperatur sig at være den væsentligste. Paa Næringsgelatiner indtraadte en lignende Omdannelse derimod under Indvirkning af kemiske Faktorer.

Det har vist sig, at den ovenstaaende Sætning om Udviklingen af de sporeløse Varieteter i Næringsvædske ved høj Temperaturer gjælder for alle typiske Saccharo-

myceter. Endvidere har det vist sig at være Regel, at Tabet af Spore- og Hindedannelsen under den beskrevne Behandling følges ad. De ældste sporeløse Varieteter vare, da Afhandlingen udgaves, snart 12 Aar gamle, mange 3 Aar og derover. Uagtet de i den lange Tid blev dyrkede under de mest forskellige Forhold, havde de dog holdt sig. En dybt indgribende og konstant Omdannelse har fundet Sted.

5te Række.

Undersøgelser fra Gjæringsindustriens Praxis. *C. L. Medd.* 2, 93—102 (1883), 257—322 (1888), 3, 149—255 (1892).

Disse Undersøgelser hvile paa de foregaaende og begyndte omtrent samtidigt med disse; først fra 1888 blev de udgivne som en særlig Række. Blandt de ovennævnte tidligere Undersøgelser findes flere, som høre til nærværende Række; saaledes f. Ex. en Del af Undersøgelserne over Mikroorganismene i Luftens Støv. Til disse slutter sig i nærværende Række den nye Undersøgelse om den gjæringstekniske Analyse af Vandets Mikroorganismer. Den kom navnlig frem som en Protest mod den i Slutningen af Firserne herskende Misforstaaelse, at den biologiske Analyse af Vandet i Bryggerierne kunde foretages efter den hygiejniske Fremgangsmaade. Hansen meddelte i den Anledning en Methode efter gjæringstekniske Principer, og med den som Udgangspunkt gav han sammenlignende Analyser, hvoraf fremgik, at Resultaterne af denne Methode langt fra falde sammen med Resultaterne af den hygiejniske.

De af Hansens Undersøgelser, som have direkte Betydning for Gjæringsindustrien, samle sig om tre Hovedspørgsmaal: om Øllets Sygdomme, om Gjærens Rendyrkning og om Anvendelsen af planmæssig udvalgte Gjærarter eller -Racer.

Angaaende Spørgsmaalet om Øllets Sygdomme var de forskellige Muligheder diskuterede, da Hansen begyndte sine Undersøgelser. Særlig var den Sygdom, man kalder Gjærtykhed, den Gang meget omtalt i Literaturen, da den foraarsagede Bryggerierne store Tab. Om Aarsagen gik Meningerne i forskjellig Retning. Man havde hidtil ved Undersøgelsen af saadanne Tilfælde maattet indskrænke sig til den mikroskopiske Analyse. Betydningen af Hansens Arbejder paa dette Omraade ligger særlig deri, at han for første Gang gav en experimental Bevisførelse. Han kløvede Gjæren fra sygt Øl i dens Elementer og paaviste, at den ved Siden af god Ølgjær indeholdt vilde Gjær-

arter, og at disse fremkaldte Sygdomsfænomenet, naar de i visse Forhold blev blandede med Ølgjæren. Hermed var disse Spørgsmaal bragte til en videnskabelig Afgjørelse og Vejen anvist til Fjernelsen af Sygdommene. I de foranstaaende Afhandlinger fra 1882 og 83 omtales hans første Undersøgelser i den Retning; de blev fortsatte efter en større Maalestok i nærværende Række og førte til en Afslutning. Udgangspunktet var de Sygdomme, der i Begyndelsen af Firserne optraadte i Bryggerierne »Tuborg« og »Gamle Carlsberg«: Gjærtykthed, ubehagelig Lugt og Smag af Øllet. I alle Tilfælde bleve Sygdomsgjærarterne udfundne og Sygdommens Gang oplyst. Den Hovedregel fandtes at gjælde, at Sygdommen kun optraadte, naar de vilde Gjærarter blev indførte ved Hovedgjæringens Begyndelse.

Den ejendommelige Iagttagelse blev gjort, at en Paasætningsgjær, som bestaaer af en Blanding af to gode Bryggerigjærarter, giver mindre holdbart Øl, end naar den kun bestaaer af en Art alene. I saadanne Blandinger optræder den Art, der er til Stede i det ringeste Mængdeforhold, som en Sygdomsgjærart.

Som Alle paa den Tid ansaa Hansen i Begyndelsen af sine Studier *Saccharomyces cerevisiæ* som en systematisk Enhed; men her saavel som overfor de andre af Reess opstillede Arter fandt han, som ovenfor berørt, at enhver af dem lader sig kløve i flere Racer og Arter. Ved direkte Forsøg iagttog han dernæst, at de af ham saaledes fremstillede Kulturgjærarter gav Øl af ofte meget forskjellig Beskaffenhed. Hidtil havde al Gjær, som anvendtes i Industrien, været en Blanding af ubekjendte Arter og i vexlende Sammensætning. Ved de ovenfor omtalte Undersøgelser kom Hansen til at indføre et nyt Princip i Gjæringstekniken, nemlig Udvalgelsen af bestemte Gjærracer og -Arter, og for Bryggerivæsenet opstillede han nu den Sætning, at Paasætningsgjæren kun maa indeholde en eneste Art, nemlig den for det specielle Bryggeri gunstigste. Hertil anvendte han sin ovenfor omtalte Encellekultur og udarbejdede derpaa en sikker Fremgangsmaade til en fabrikmæssig Fremstilling af rendyrket Gjær til Brug i Industrien, endvidere Metoder til Renkulturernes Opbevaring og Forsendelse, til Analyse af Paasætningsgjæren og af Øllet i Lagerfadene med Hensyn til dets Holdbarhed.

I 1883 lykkedes det Hansen at gennemføre den nævnte radikale Reform i Bryggeriet »Gamle Carlsberg«, og derfra spredte den sig trods den Modstand, der blev rejst derimod fra flere Sider, dog ret hurtig til alle ølbryggende Lande Jorden over.

Han fremhævede den Betydning, denne Reform ogsaa har i Spiritus- og Pressegjærfabrikationen samt ved Vingjæringen. I de senere Aar er den ligeledes bleven indført i disse Industrigrene og for en Del gennem Elever, der havde studeret paa Carlsberg Laboratoriet. I et særligt Kapitel meddeler Hansen Adresserne paa de Fabriker, i hvilke hans Methode til Stadighed anvendes; det er en af de Veje, ad hvilke han har søgt at bekæmpe den Modstand, hans Arbejde mødte.

Til nærværende Række kan ogsaa nærmest henføres Afhandlingen i *C. L. Medd.* 3, 33—52 (1891): »Hvad er Pasteurs rene Gjær?« Denne Undersøgelse blev fremkaldt ved Angreb fra fransk Side, som gik ud paa, at Hansen havde taget fejl, og at Pasteurs Methode til Fremstilling af ren Gjær (Behandlingen af Bryggerigjær i en Opløsning af Saccharose med lidt Vinsyre) derimod var den rette. Det viste sig, at man herved vel kan befri Gjæren for Bakterier, og dette var Pasteurs Formaal, men at man ikke paa den Maade opnaaer en virkelig Renkultur. Ved at anvende de skarpe Metoder, som Hansen havde udarbejdet, traadte det frem, at Pasteurs Fremgangsmaade med Hensyn til Gjærcellerne selv gav det Resultat, at de gode Ølgjærarter blev undertrykte og Sygdomsgjærarterne begunstigede, der blev altsaa i den Henseende opnaaet det Modsatte af, hvad man maatte ønske. I Tilslutning til disse Undersøgelser viser Hansen, hvorledes Vinsyre-Metoden derimod kan faa en anden og vigtig Anvendelse, nemlig til Kontrol af Gjæren i de store Rendyrkningsapparater; hertil anvendes den nu ogsaa almindeligt. Af den til Spørgsmaalet hørende Litteratur gives en udførlig Fremstilling. Fra Pasteur selv foreligger der i 1887 følgende Udtalelse: »Hansen er den første, der har indset, at Bryggerigjæren maa være ren ikke blot i Henseende til Bakterier, de egentlige Sygdomsfermenter, men at den ogsaa bør være befriet for de vilde Gjærarter.«

Der er i Aarenes Løb udkommet nye Udgaver paa Tydsk og Engelsk af nærværende Række, hvori et og andet er blevet tilføjet, som ikke findes i den danske ældre Udgave.

Ogsaa efter Udgivelsen af nærværende Rækkes anden Afdeling i 1894 foreligger der fra Hansens Haand Undersøgelser, som gaa i praktisk Retning, hertil hører f. Ex. det Afsnit i hans anden Afhandling om Eddikesyre bakterierne, som handler om disse Organismers Forhold til Ølfabrikationen. Og i hans Afhandling over Variationen hos Saccharomyceterne (1900) ville vistnok de

der angivne Metoder til Fremstilling af nye Racer af Bryggerigjær kunne faa praktisk Betydning.

I *C. L. Medd.* 1, 328 (1881) offentliggjorde Hansen en Meddelelse om »Et fugtigt Kammer til Dyrkning af Mikroorganismer«. Da den ikke kan finde Plads under nogen af de nævnte Rækker, anføres den her.

Hansens Arbejder have saavel mødt Ros som Angreb; Literatur-Henvisninger hertil findes i Haand- og Lærebøgerne, navnlig i Klöckers: *Die Gärungsorganismen* (s. S. 47 n).

I andre Tidsskrifter offentliggjorde han af og til foreløbige Meddelelser til de Afhandlinger, der senere fremkom i udførlig Skikkelse i Laboratoriets Tidsskrift, ogsaa Referater og enkelte Afhandlinger over andre Emner.

I *Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf.*, 2te Abt., 5, 1 (1899), gav han en foreløbig Meddelelse om nogle nye Undersøgelser over Forholdet mellem Knopskydning og Sporedannelse og om Betingelserne for den sidstnævnte Funktion. Hansen vender sig mod den Opfattelse, der i den nyere Tid atter er traadt frem, at Næringsmangel skal være en nødvendig Betingelse for Sporedannelsen. Forsøgene viste tvertimod, at den kraftigt ernærede Celle tillige er den kraftige Sporedanner. Næringsmangelen spiller kun en Rolle, forsaavidt den er en af de Faktorer, der standse Knopskydningen. Dette sidste kan ogsaa opnaaes ad andre Veje, f. Ex. ved at anbringe Cellerne i en mættet Opløsning af svovlsur Kalk, og den unge Celle, som er rig paa Næringsstof, danner da strax Sporer, naar ellers de øvrige Betingelser (Luft og passende Temperatur) ere tilstede.

I flere Aar var han foruden med de ovennævnte Studier ogsaa beskæftiget med biologiske og systematiske Undersøgelser over højere Svampe, navnlig Agaricineerne i Skovene omkring Kjøbenhavn. Han gav nogle Meddelelser herom i *det kgl. danske Vid. Selskabs Oversigter*, i *Botanische Zeitung* 1897 og derefter ved Naturforskermødet i Stockholm 1898.

Til hans Virksomhed hører ligeledes, at han i Aarenes Løb har uddannet et stort Antal Elever saavel Danske som Udlændinge.

LAVRITS KNUDSEN.

Om Vedligeholdelse af konstant Temperatur. *C. L. Medd. 2*, 134—145 (1884).

Der beskrives og afbildes et Apparat til Vedligeholdelse af konstant Gastryk, en Thermoregulator, samt en Thermostat.

JUST CHR. HOLM og S. V. POULSEN.

Hvor ringe en Infektion af »vild Gjær« kan efter Hansens Methode paavises i en Undergjærmasse af *Saccharomyces cerevisiæ*? *C. L. Medd. 2*, 147—151 (1886) og 211—219 (1886).

Methoden prøves paa Blandinger af 20 Kulturgjærarter med 3 vilde Gjærarter; det viste sig, at selv $\frac{1}{200}$ vild Gjær kan paavises. Der gives derpaa en detailleret Anvisning til Methodens Anvendelse i Analysen af Bryggerigjær.

JUST CHR. HOLM.

I. Om Rendyrkningsmetoderne og særlig om Kochs Pladekultur og dens Fejlgrændse. *C. L. Medd. 3*, 1—32 (1891).

Resultatet af Forsøgene med Kochs Pladekultur var, at der gjennemsnitlig kun dannes 100 Kolonier af 108 Celler, og at man altsaa ikke har fuld Sikkerhed for at faae en Renkultur ved denne Methode.

II. Biologiske og gjæringstekniske Analyser af Vand til Bryggeribrug. *C. L. Medd. 3*, 122—148 (1892).

Den af Hansen angivne Fremgangsmaade anvendes, og dens Betydning belyses. Der meddeles Resultater af talrige biologiske Vandanalyser, foretagne til alle Aarets Tider og i Tilslutning til Forholdene i Praxis.

J. CHR. NIELSEN.

Sporernes Udviklingsgang hos *Sacch. membranae-faciens*, *Sacch. Ludwigii* og *Sacch. anomalus*. *C. L. Medd.* 3, 256—264 (1894).

Der gives en kort Beskrivelse af de 3 nævnte Arter, og Kurverne for Sporernes Udvikling bestemmes paa samme Maade, som Hansen har gjort det for de øvrige af ham opstillede Arter.

ALB. KLÖCKER.

I. Undersøgelser over *Saccharomyces Marxianus*, *Sacch. apiculatus* og *Sacch. anomalus*. *C. L. Medd.* 4, 63—76 (1895).

Temperatur-Kardinalpunkterne for Sporedannelsen hos *Sacch. Marxianus* bestemmes.

Der anstilles Forsøg fra nye Synspunkter med *Sacch. apiculatus* for atter at prøve, om denne Art kan danne Sporer eller ej, men Resultatet bliver, som tidligere, negativt.

Fra anden Side var kommen Meddelelse om Opdagelsen af et nyt og vigtigt morfologisk Forhold hos *Sacch. anomalus*. Da dette vilde have stor Betydning for *Saccharomyceternes* Systematik, prøves det, men viser sig ikke at existere.

II. Kan Enzymdannelsen hos Alkoholgjærsvampene anvendes som Artsmærke? *C. L. Medd.* 5, 55—60 (1900).

Ogsaa for Alkoholgjærsvampenes Systematik er Studiet af Enzymdannelsen vigtigt, idet Hansens Undersøgelser have godtgjort, at man her har en fast Karakter. Dubourg har dog i *Compt. rend. de l'Acad. des Sciences* 128, 440 (1899) erklæret, at den er uden Betydning i den nævnte Henseende, og denne Anskuelse er optaget af Duclaux i hans nye store Haandbog. Ved at gaa frem efter den af Dubourg angivne Fremgangsmaade, viste det sig imidlertid, at hans Meddelelser ere urigtige, og det blev paany bekræftet, at Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne er en konstant og vigtig Karakter.

Desuden har Klöcker forfattet Afsnittet: Theoretisches über Gärung i Leyser-Heiss: *Die Bierbrauerei*. 10. Aufl. 1900, Pag. 538—601, og *Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe*, Stuttgart 1900, xvi + 318.

Denne Bog har en særlig Interesse for den nærværende Oversigt derved, at de i Aarenes Løb af Hansen og hans Assistenters udarbejdede Apparater og Arbejdsmethoder, som ikke før ere beskrevne, her findes fremstillede i Text og Afbildninger.

ALB. KLÖCKER og H. SCHIÖNNING.

I. Hvad vide vi om Saccharomyceternes Stamformer?
C. L. Medd. 4, 85—144 (1896).

Der gives en Oversigt over dette Spørgsmaals Historie, som jo flere Gange har spillet en ejendommelig Rolle i Læren om Alkoholgjærsvampene. For Tiden have atter nogle Forskere paa-staaet, at Saccharomyceterne kun ere Udviklingsformer af andre Svampe. En saadan Paastand, der en Tid lang syntes at være begrundet, var den nærmeste Foranledning til dette Arbejde. Der meddeles i dette talrige Forsøg med en hel Række forskellige Svampe for eventuelt at faae dem til at udvikle Saccharomyces. De foretoges dels i Laboratoriet, dels i Naturen, men i intet Tilfælde fandt en Saccharomyces-Udvikling Sted. Og omvendt fremkom ej heller andre Svampeformer ved Dyrkning af Saccharomyces paa forskjellig Maade. Hovedresultatet blev, at man fremdeles maa opfatte Saccharomyceterne som selvstændige Svampe, hvis Plads i Systemet er under Ascomyceternes i Nærheden af Exoasceerne.

II. Om Gjennemvoxningsfænomener og abnorm Konidiedannelse hos *Dematium pullulans*, de Bary, og andre Svampe. *C. L. Medd. 5*, 44—54 (1900).

Hvad nogle Forskere have opfattet som en Endosporedannelse hos *Dematium pullulans* vises at være en endogen Konidiedannelse og et Gjennemvoxningsfænomen. Disse endogene Konidiers Udvikling forfølges under Mikroskopet, og der angives en Methode til Fænomenets Fremkaldelse. Dette ejendommelige Forhold paa-vises for første Gang ogsaa hos *Oidium lactis* og hos en anden *Oidium*-Art.

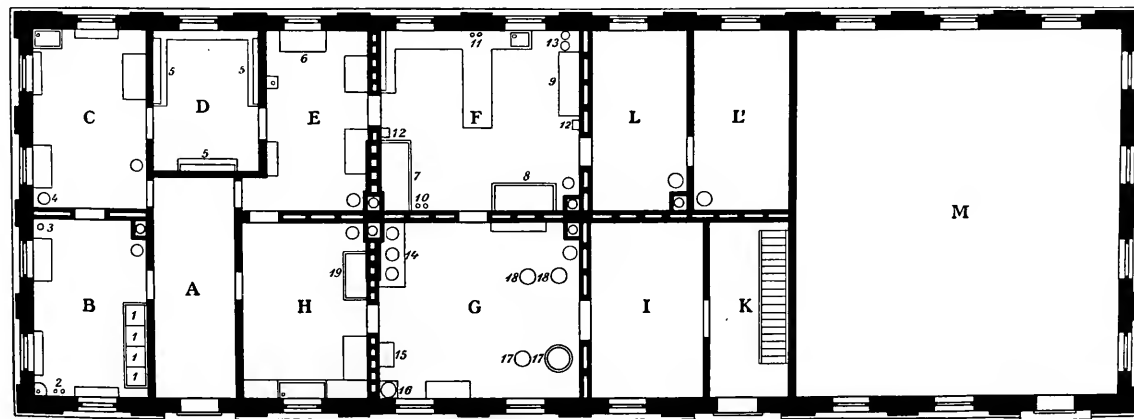
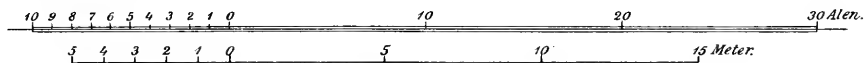
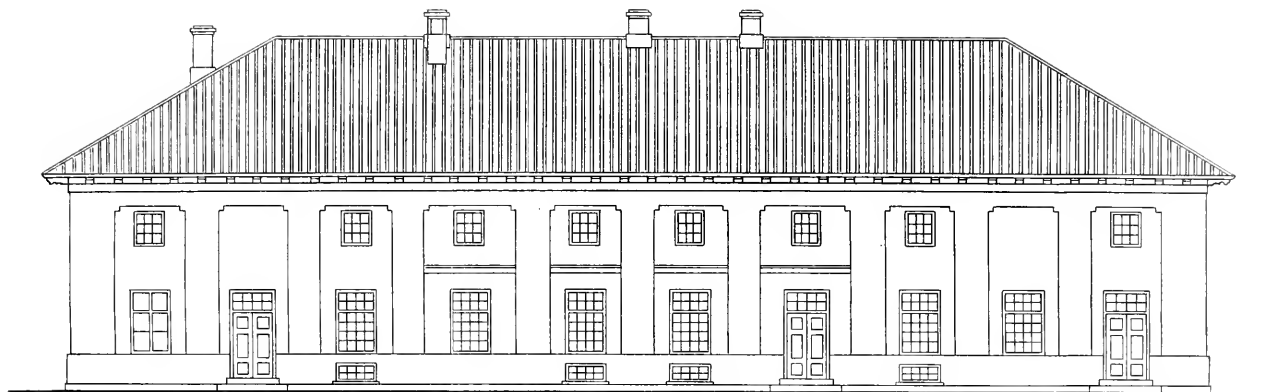
H. SCHIÖNNING.

I. En ny og ejendommelig Ascusdannelse hos en Gjærsvamp. *C. L. Medd. 4*, 77—84 (1895).

Hos *Schizosaccharomyces octosporus* gjorde Forf. den interessante morfologiske Iagttagelse, at Ascusdannelsen foregaaer derved, at to Celler smelte sammen til en. Begge disse Celler fremkomme kort iforvejen ved Deling af en Celle.

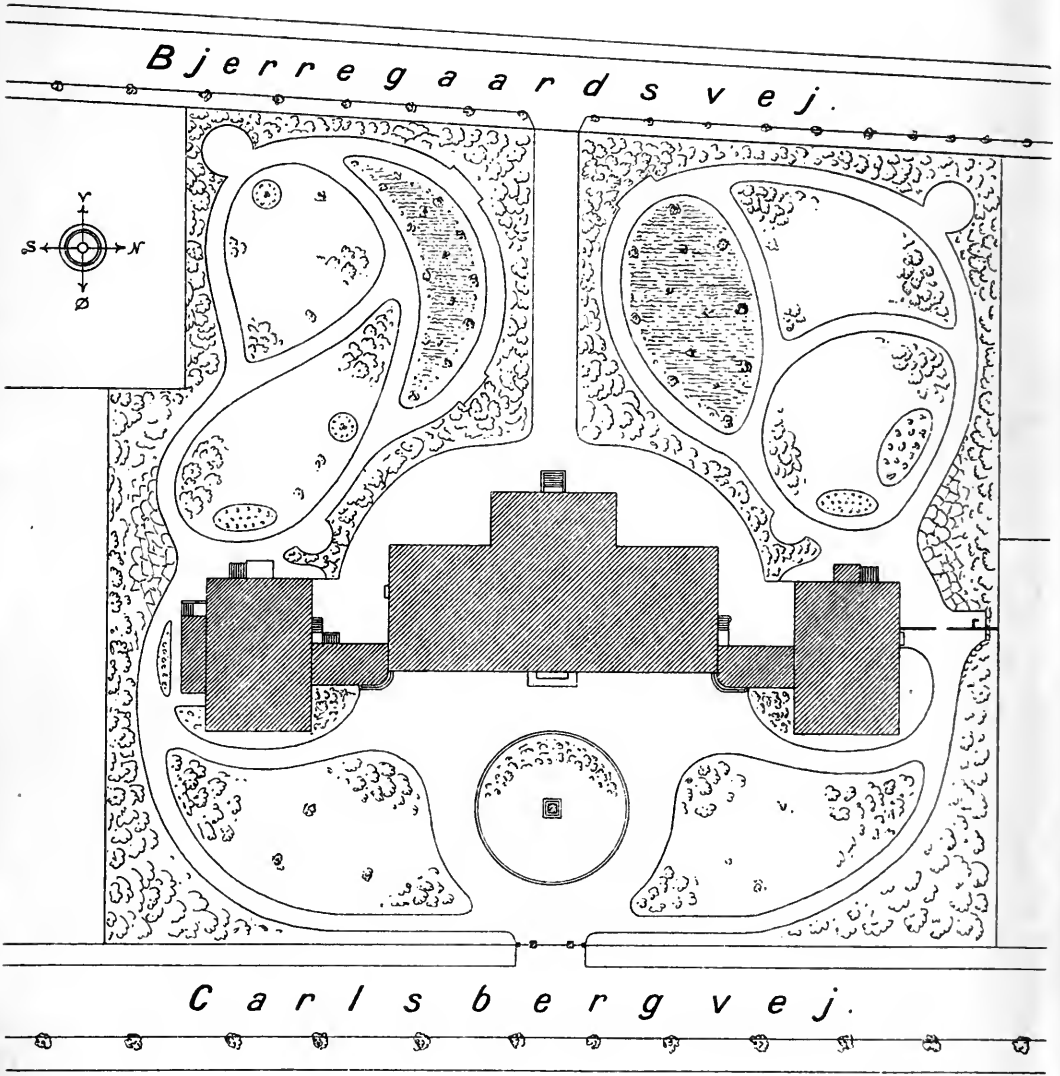
II. En Kolbe til Gibsblokkkulturer. *C. L. Medd. 4*, 193—197 (1896).

Gibsblokken gives Form af en lille Cylinder, der anbringes i en Freudenreich-Kolbe, hvori den steriliseres.

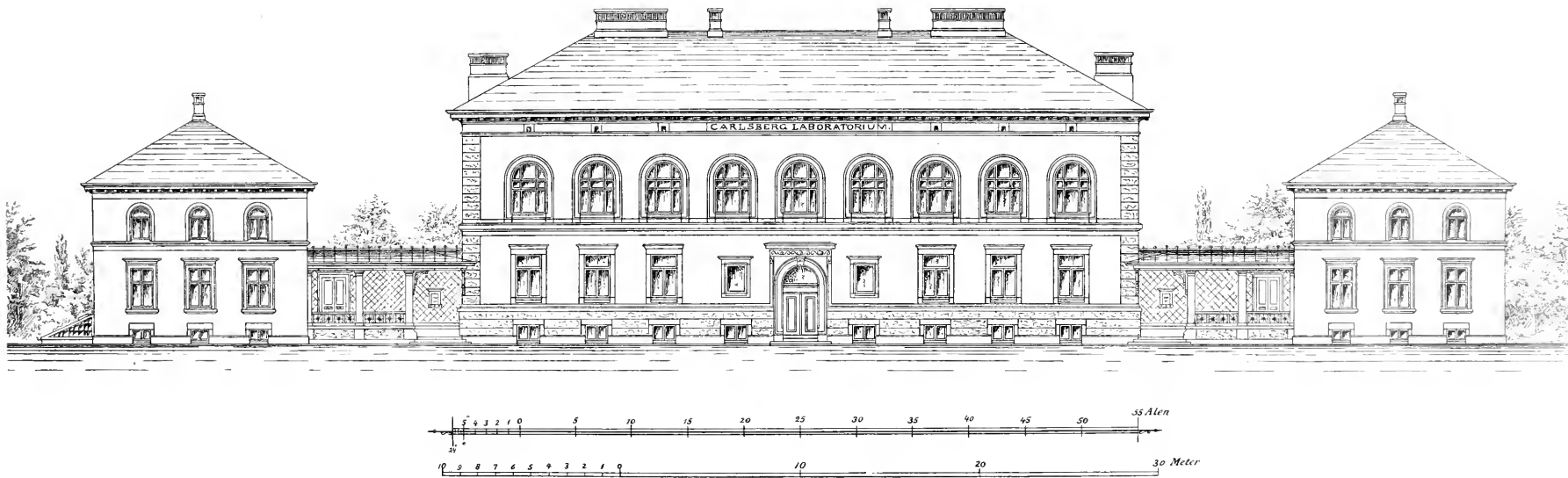


PLAN OG FACADE AF DET ÆLDRE LABORATORIUM

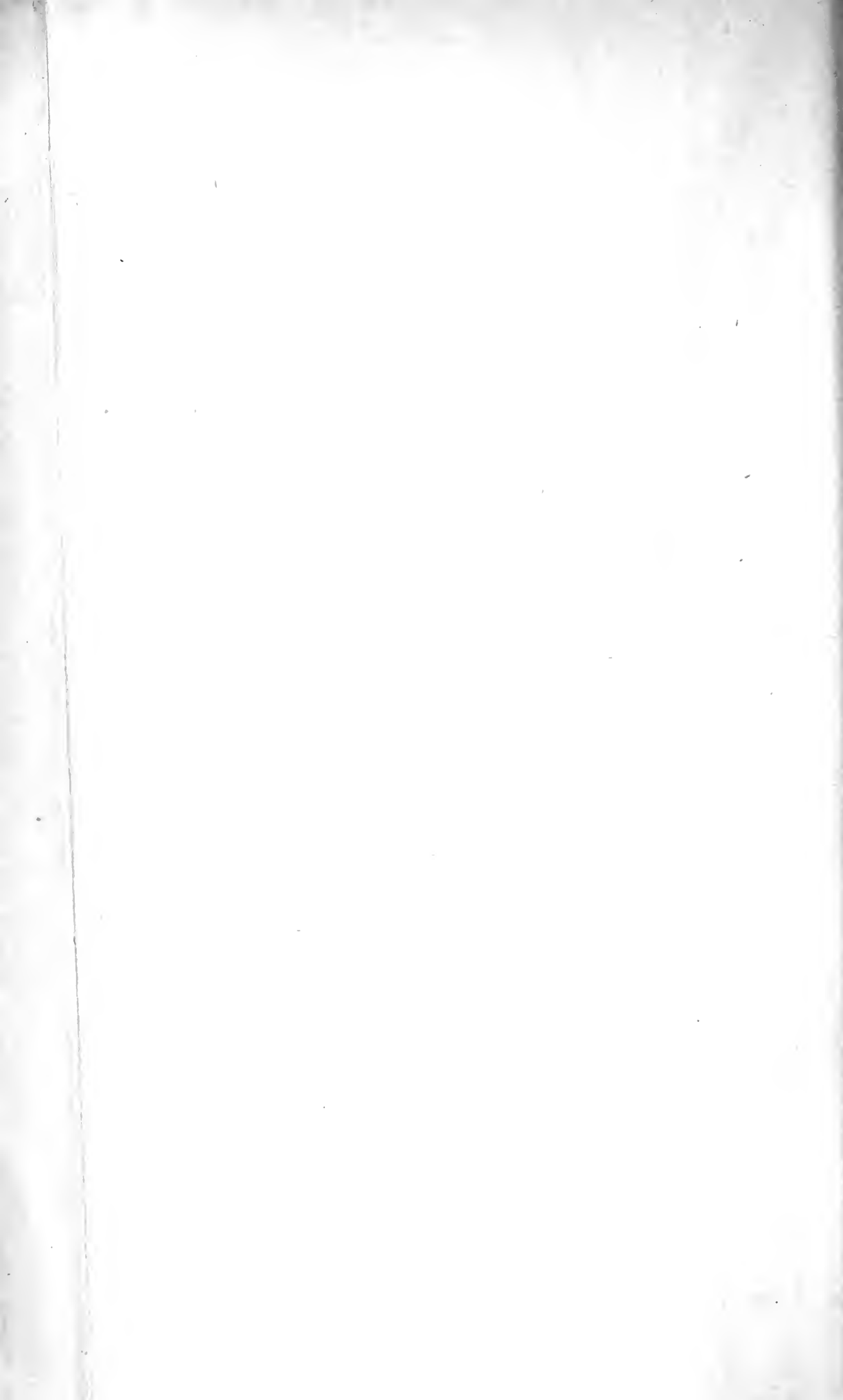


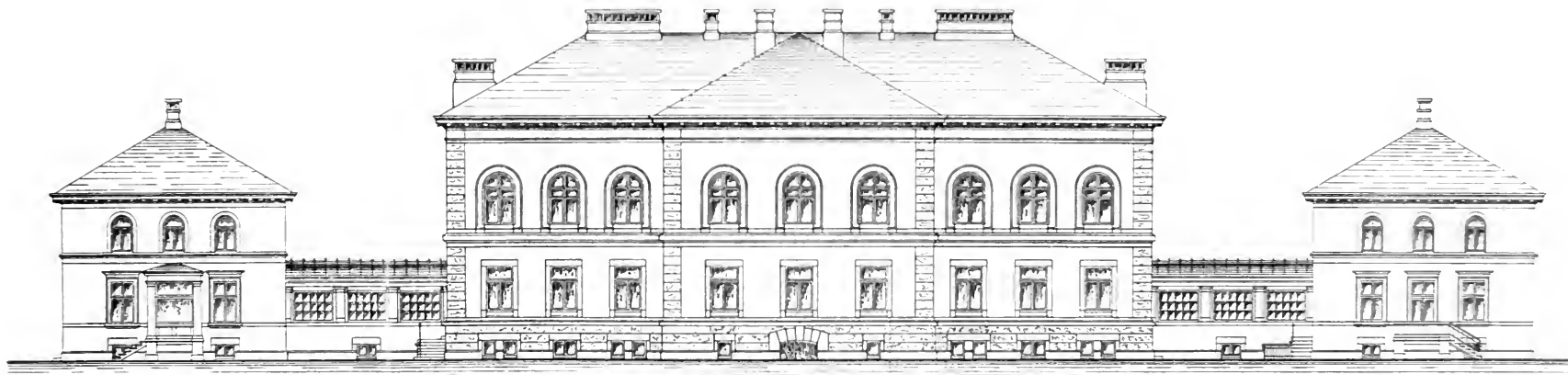


SITUATIONSPLAN



FACADE MOD CARLSBERGVEJ

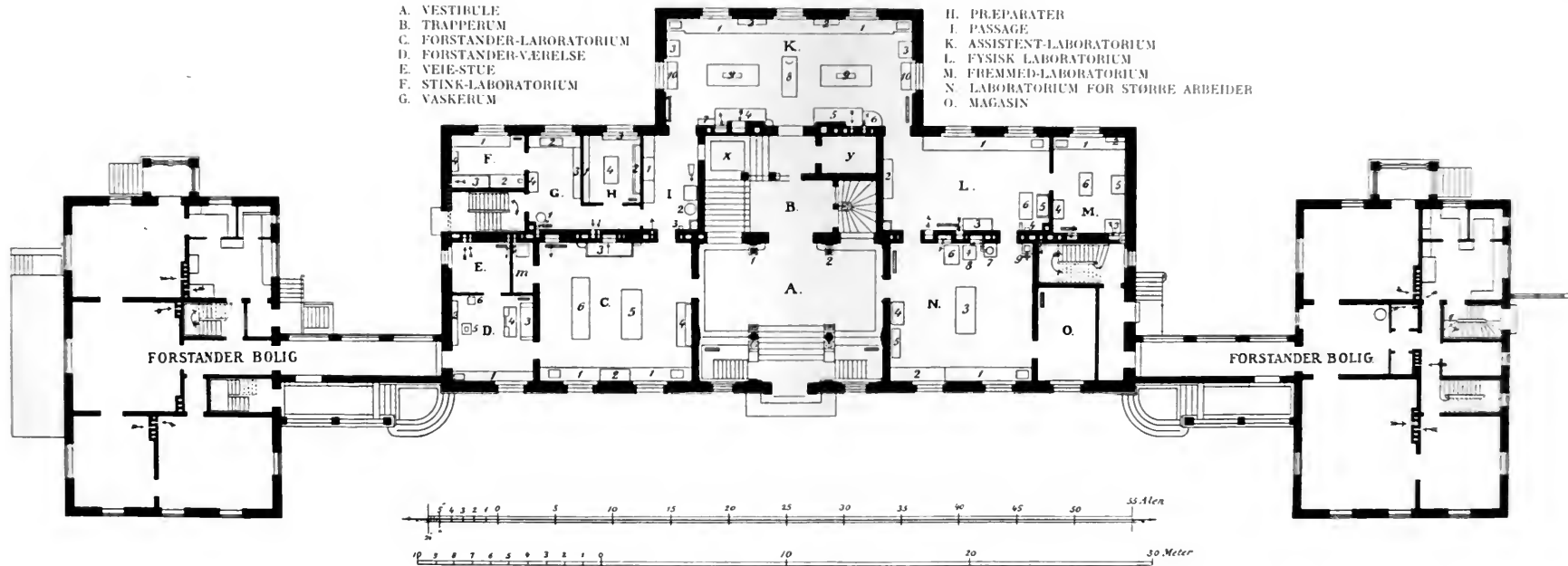




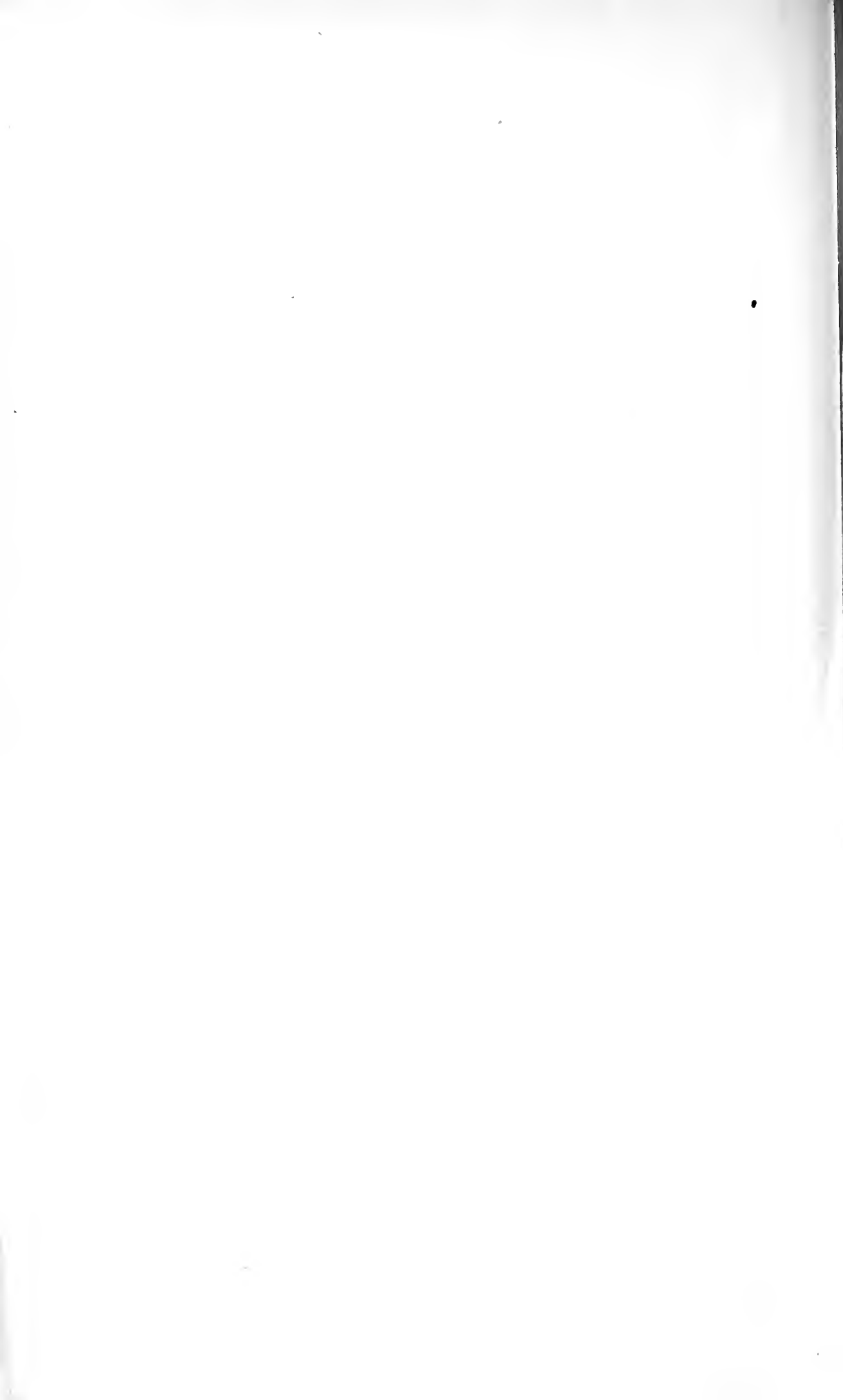
FACADE MOD BJERBEGAARDSVEJ

- A. VESTIBULE
 B. TRAPPERUM
 C. FORSTANDER-LABORATORIUM
 D. FORSTANDER-VEREELSE
 E. VEIE-STUE
 F. STINK-LABORATORIUM
 G. VASKERUM

- H. PREPARATER
 I. PASSAGE
 K. ASSISTENT-LABORATORIUM
 L. FYSISK LABORATORIUM
 M. FREMMED-LABORATORIUM
 N. LABORATORIUM FOR STØRRE ARBEIDER
 O. MAGASIN

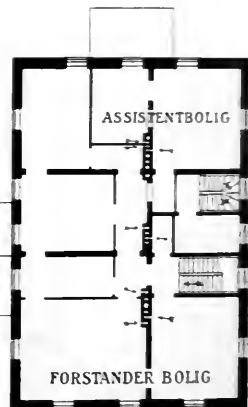
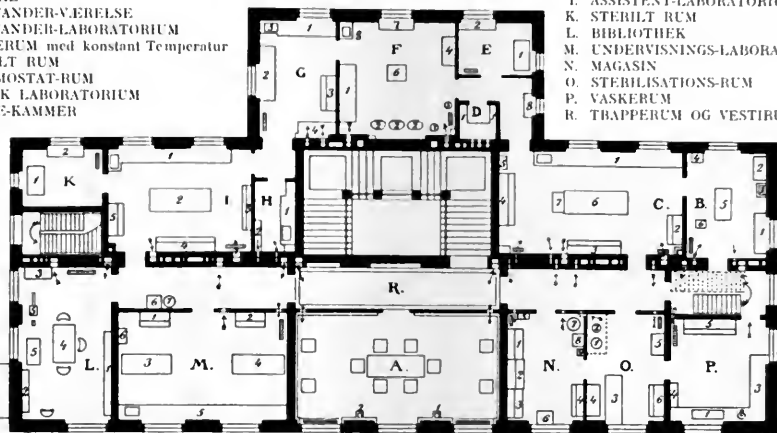
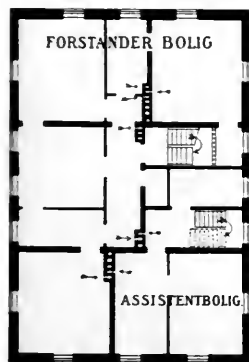


PLAN AF STUEN

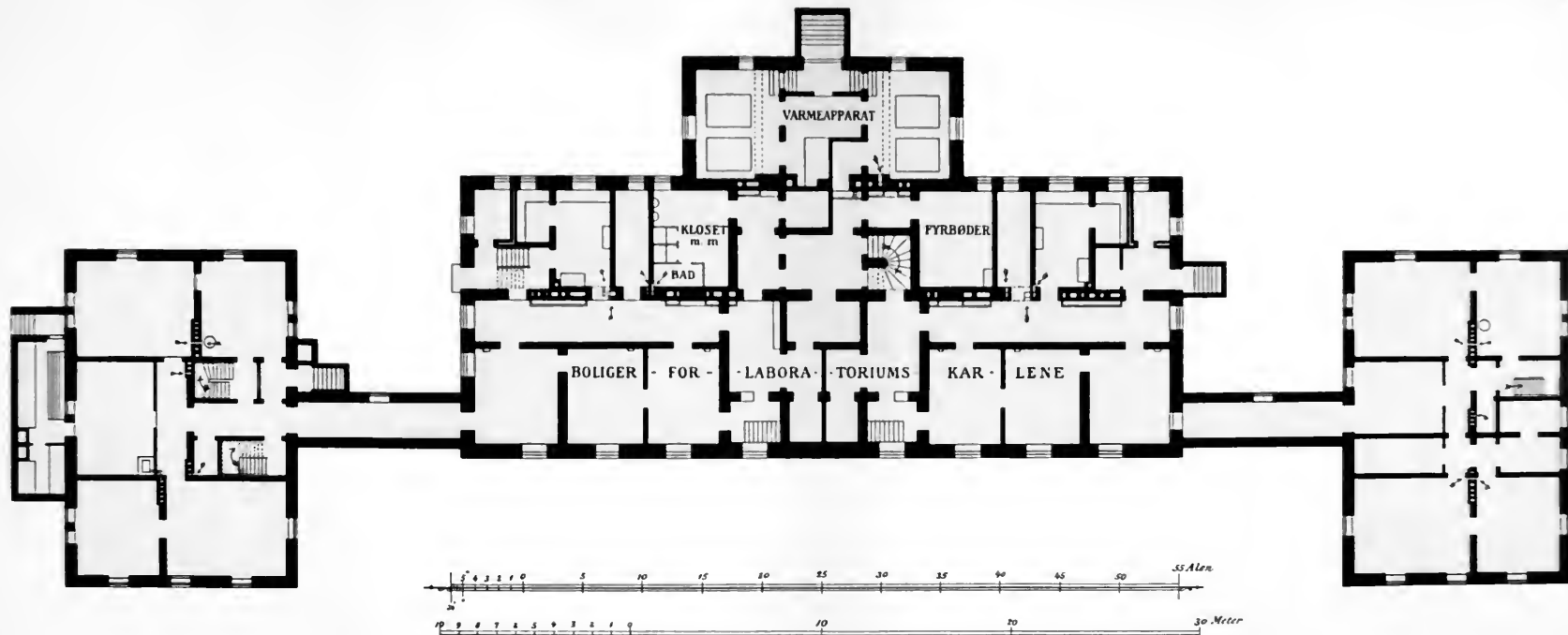


- A. FESTSAL
 B. FORSTANDER-VÆRELSE
 C. FORSTANDER-LABORATORIUM
 D. VARMERUM med konstant Temperatur
 E. STERILT RUM
 F. THERMOSTAT-RUM
 G. KEMISK LABORATORIUM
 H. MØRKE-KAMMER

- I. ASSISTENT-LABORATORIUM
 K. STERILT RUM
 L. BIBLIOTHEK
 M. UNDERVISNINGS-LABORATORIUM
 N. MAGASIN
 O. STERILISATIONS-RUM
 P. VASKERUM
 R. TRAPPERUM OG VESTIRULE.



PLAN AF FORSTE SAL



PLAN AF KJELDEREN

COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

6^{ME} VOLUME.

ÉDITION FRANÇAISE.

1903—1906.



COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1906

TABLE DES MATIÈRES DU TOME SIXIÈME.

Première livraison, 1903.

	Page
Études sur la synthèse des acides amidés par S. P. L. SORENSSEN.....	1
I. Éther phtalimidomalonique.....	6
1. Préparation et propriétés.....	6
2. Éther phtalimidosodomalonique.....	10
II. Phénylalanine.....	13
1. Éther benzylphtalimidomalonique.....	14
2. Acide phtalamique-benzylmalonique tribasique.....	17
3. Phénylalanine.....	18
III. Acide α -aminoadipique.....	20
1. Éther butyronitrile-phtalimidomalonique.....	22
2. Acide α -aminoadipique.....	24
3. Acide benzoyl- α -aminoadipique.....	31
IV. Acide α - δ -diaminovalérique.....	32
1. Éther phtalimido- γ -phtalimidopropyl-malonique.....	34
2. Acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique.....	38
3. Acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique (ou acide ornithurique artificiel).....	44
4. Ornithurate de chaux.....	49
5. Acide monobenzoyle- α - δ -diaminovalérique (Monobenzoyleornithine)... ..	52
6. Combinaison d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne de l'acide α - δ -diaminovalérique.....	54
Appendice.....	60

Deuxième livraison, 1903.

Études sur les bactéries dites Sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière par N. HJELTE CLAUSSEN.....	64
I. Isolation des Pédiocoques qui se trouvent dans la bière et dans la levure.....	66
II. Morphologie.....	70
III. Physiologie.....	73
VI. Récapitulation et remarques finales.....	81
Une espèce nouvelle de Saccharomyces: Sacch. Saturnus Klöcker, ayant des spores caractéristiques par ALB. KLÖCKER.....	84
• Sur la classification du genre Penicillium, et description d'une espèce nouvelle formant des asques par ALB. KLÖCKER.....	92
Nouveau genre de la famille des Saccharomycètes par H. SCHIÖNNING.....	103

Troisième livraison, 1905.

	Page
Sur la méthode de Kjeldahl pour le dosage de l'azote par S. P. L. SØRENSEN et C. PEDERSEN.....	126
1. Créatine.....	132
2. Créatinine.....	133
3. Acide urique.....	134
4. Combinaisons de lysine.....	134
Études sur la synthèse des acides aminés par S. P. L. SØRENSEN.....	137
V. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.....	137
1. Éther γ -brompropyle-phtalimidomalonique.....	148
2. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.....	150
3. Transformation de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique en acide pyrroli- dine- α -carbonique.....	168
4. Glycocolle allylique.....	186
La Teneur en azote de la lysine et des composés analogues peut-elle être dosée par la méthode de Kjeldahl? Par S. P. L. SØRENSEN et A. C. ANDERSEN...	193
Études sur la synthèse des acides aminés par S. P. L. SØRENSEN.....	209
VI. Dédoublement de l'acide ornithurique racémique en formes optiquement actives.....	209
1. Ornithurate droit de brucine.....	210
2. Ornithurate gauche de cinchonine.....	215
3. Acides ornithuriques droit et gauche.....	219
4. Ornithurates droit et gauche de chaux.....	222
5. Ornithines monobenzoyliques droite et gauche.....	223
6. Combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne des ornithines droite et gauche.....	224

Quatrième livraison, 1906.

On the Proteïne Substances of Barley, in the Grain itself and during the Brewing Processes. By H. SCHJERNING.....	229
First Section: On the Formation and Transformation of Proteïne Sub- stances during the Growth, Ripening and Storage of Barley.....	231
1. Introduction.....	231
2. Methods of Working.....	238
3. Experimental Errors.....	250
4. Principal Experiments.....	255
5. Interpretation of the Barley Ripening Experiments.....	267
6. The Barley Ripening and Storage Experiments viewed from a prac- tical standpoint.....	285
7. Researches on the Chemical Composition of the Dry Matter of Bar- ley as dependent on Differences of Species, Variety and Type.....	291
8. Concluding Remarks.....	303
9. Main Results.....	305

ÉTUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMIDÉS

PAR

S.-P.-L. SØRENSEN

Parmi les produits de la décomposition des substances protéiques, les acides amidés ont toujours occupé une place importante, qui leur a encore été maintenue par les nombreuses et profondes recherches faites pendant ces dix dernières années. A côté des acides monoamidés monobasiques (glycine, leucine, alanine, tyrosine, etc.) connus déjà depuis longtemps, et des acides monoamidés bibasiques (acides asparaginique et glutaminique), les recherches exécutées par Drechsel, Schulze, Hedin, Kossel, et plusieurs autres savants, surtout quelques élèves de Kossel, ont placé, comme des produits de décomposition très importants, les acides diamidés lysine et ornithine, avec l'arginine, qui s'y rattache, ainsi qu'une base d'une composition jusqu'ici inconnue: l'histidine. D'ailleurs, la belle méthode récemment indiquée par E. Fischer¹⁾ pour la séparation des acides amidés par voie de distillation fractionnée de leurs éthers, effectuée dans le vide, a déjà, dans plusieurs cas, soutenu l'épreuve et promet la découverte de nouveaux produits de décomposition, inconnus jusqu'ici, de la classe des acides amidés.

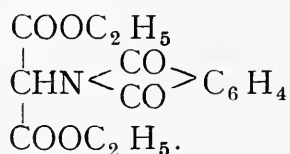
Comme de nouveaux produits de décomposition ne s'obtiennent en général que par quantités extrêmement faibles et souvent à grand'peine, il importe pour une étude tant soit peu approfondie que les recherches synthétiques marchent de pair avec les analytiques, soit qu'on se propose d'isoler et identifier de nouveaux produits de décomposition, soit qu'on vise à former

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 433 (1901), et XXXV, 2162 (1902).

des combinaisons encore plus compliquées, en prenant ces produits-là pour point de départ. Par conséquent, il serait d'une assez grande importance de pouvoir arriver à préparer par synthèse, sans trop de difficulté et avec un rendement satisfaisant, ces combinaisons si importantes pour l'étude des protéines, tant celles qu'on a déjà trouvées parmi les produits de décomposition que celles qui y sont apparentées.

C'est en partant de considérations de ce genre que j'ai élaboré la méthode que je vais décrire pour la préparation des acides α -amidés. Voilà aussi pourquoi je n'ai voulu me contenter de pouvoir préparer à l'état de pureté les combinaisons dont il s'agit; au contraire, j'ai varié les procédés particuliers en vue de découvrir la voie à suivre pour obtenir le meilleur rendement, et pour faciliter l'emploi de ma méthode, j'ai compris dans la description de celle-ci tous les détails de quelque importance. La méthode en question, applicable à la préparation d'un très grand nombre d'acides α -amidés (et presque tous les acides amidés obtenus jusqu'ici par la décomposition des protéines appartiennent à cette classe), est fondée sur les belles synthèses effectuées par S. Gabriel au moyen du phtalimide potassique.

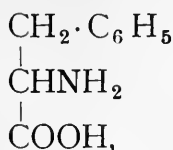
L'éther malonique est transformé, d'après Knoevenagel¹⁾, en éther monobromomalonique qui, traité convenablement par le phtalimide potassique, donne l'éther phtalimidomalonique:



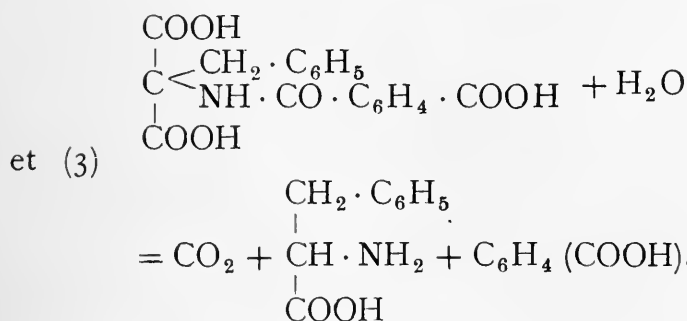
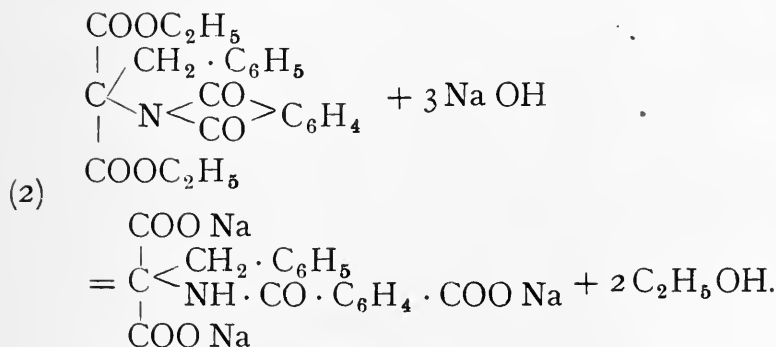
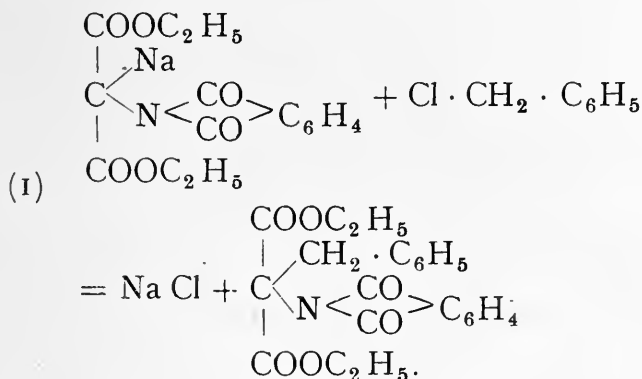
Cette combinaison, qu'on peut obtenir à l'état pur avec un rendement égal à plus de 80% de celui donné par le calcul, sert de point de départ pour la préparation des acides α -amidés, la combinaison sodique traitée par un composé haloïde convenable donnant un produit qui, porté à l'ébullition avec de l'acide chlorhydrique ou, ce qui d'ordinaire est préférable, quand on le traite d'abord par une solution d'hydroxyde de sodium et puis l'évapore avec de l'acide chlorhydrique, fournit le chlorhydrate de l'acide amidé désiré.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXI, 1355 (1888).

Dans le cas des acides monoamidés monobasiques j'ai choisi à titre d'exemple la phénylalanine :

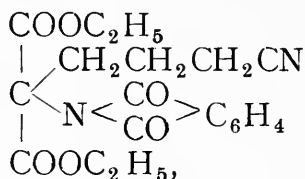


dans la préparation de laquelle on a employé comme combinaison halogénée le chlorure de benzyle, d'après les équations que voici :

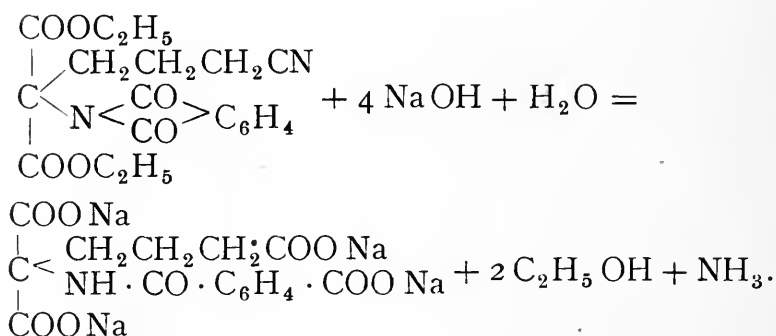


On voit aisément que, si l'on se sert d'autres combinaisons d'halogène, on aura des acides amidés différents; c'est ainsi que, par exemple, les 4 bromures de butyle donneront 4 acides α -amino-caproïques isomères, dont on n'a préparé jusqu'ici que 2, à savoir l'acide α -aminocaproïque normal et l'acide α -amino-isobutyle-acétique.

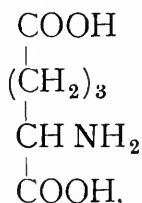
Pour les acides monoamidés bibasiques, j'ai choisi mon exemple dans l'acide α -aminoadipique inconnu jusqu'ici et dont la composition est analogue à celles des acides asparaginique et glutaminique. Pour la préparation de cet acide nouveau je me suis servi du γ -chlorbutyronitrile: $\text{Cl CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CN}$, qu'on peut préparer facilement par la méthode de S. Gabriel¹⁾. Le phtalimidosodomalonnate d'éthyle m'a alors donné l'éther butyronitrile-phtalimidomalonique :



qui, traité par une solution d'hydroxyde de sodium, s'est décomposé comme suit :



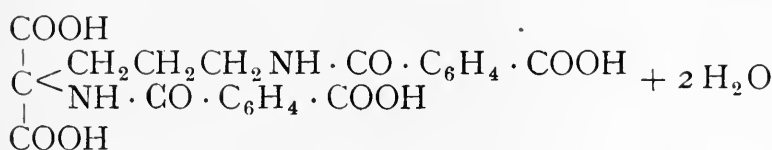
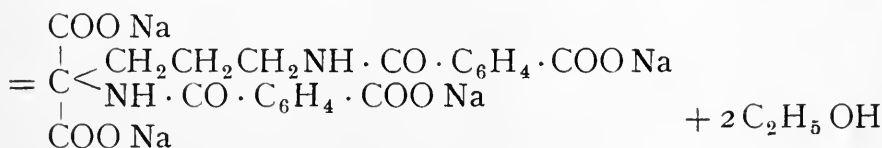
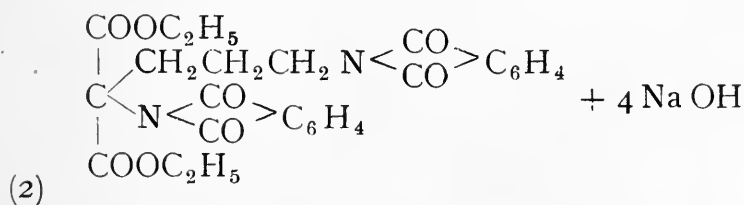
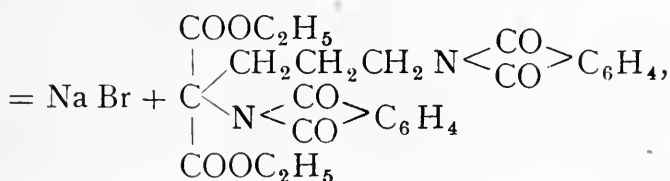
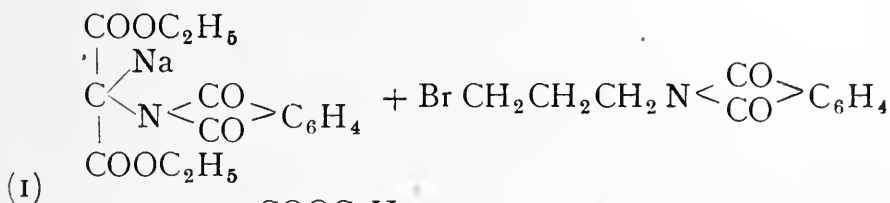
Enfin, j'ai fait évaporer avec de l'acide chlorhydrique l'acide tétrabasique formé et qui par ce dernier traitement s'est décomposé en dégageant de l'acide carbonique, déposant de l'acide phtalique et formant le chlorhydrate de l'acide α -aminoadipique :



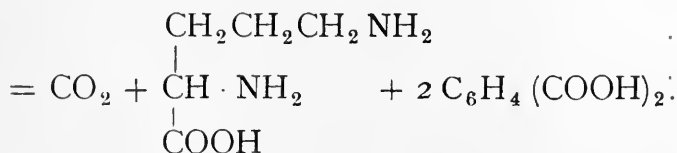
Il est évident que l'emploi de l'éther chloracétique: $\text{Cl CH}_2 \text{COOC}_2\text{H}_5$, donnera finalement l'acide asparaginique, de même que — dans des conditions convenables, afin d'empêcher l'élimination de l'hydrure d'halogène — l'éther β -chloropropionique donnera l'acide glutaminique.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXIII, 1771 (1890).

Enfin, comme exemple d'un acide diamidé, j'ai choisi l'acide α - δ -diaminovalérique, qui est vraisemblablement la forme racémique de l'ornithine de Jaffé¹⁾. La combinaison halogénée employée pour cette synthèse, était le γ -bromopropylphthalimide: $\text{Br CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{N} \begin{smallmatrix} \text{CO} \\ \diagup \diagdown \\ \text{CO} \end{smallmatrix} \text{C}_6\text{H}_4$, facile à obtenir par le procédé de J. Weiner²⁾, et voici par quelles opérations on arriva à préparer le susdit acide:



et (3)



Acide α - δ -diamino-valérianique.

Quant à la préparation de l'acide α - ε -diaminocaproïque et l'acide diaminoacétique, on voudra bien se reporter au chapitre, qui termine ce mémoire.

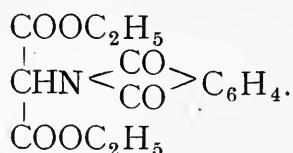
Le plan de ce travail a été dressé et l'ouvrage commencé

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. X, 1925 (1877).

²⁾ Ibid. XXI, 2671 (1888).

durant le printemps de 1901 sans que je connusse alors les synthèses des acides gras diamidés de M. E. Fischer¹⁾, dont la première partie avait déjà été présentée, en décembre 1900, à l'Académie de Berlin; il convient donc d'ajouter qu'avant de poursuivre mes études synthétiques sur les acides diamidés j'étais en correspondance avec M. E. Fischer.

I. Éther phtalimidomalonique:



1. Préparation et propriétés

A 2 mol. gr. (320 gr.) d'éther malonique j'ai ajouté goutte à goutte (d'abord lentement, jusqu'à ce que la réaction eût commencé, puis plus vite) un peu plus de 4 at. gr. de brome (104 cc., soit environ 330 gr.). L'opération, pratiquée à la température ambiante, se faisait dans un matras de la capacité de 2 l. et muni d'un tube réfrigérant à reflux, de la partie supérieure duquel le bromure d'hydrogène développé par la réaction était amené dans un flacon contenant de l'eau. Ayant ajouté goutte à goutte le brome, j'ai chauffé le matras pour en chasser le bromure d'hydrogène, d'abord au bain-marie, et puis dans le bain d'huile en même temps que dans le vide, jusqu'à ce que le contenu se mît à bouillir violemment. Le rendement obtenu en éther monobromomalonique répondit au calcul.

Pour traiter par le phtalimide potassique j'ai réparti uniformément dans cinq matras de 2 l. de capacité le dérivé bromé obtenu, et à chaque portion j'ai ajouté un peu plus de $\frac{2}{5}$ mol. gr. de phtalimide potassique (80 gr. au lieu de 74 gr.). Après l'avoir fortement agité, j'ai mis le flacon dans le bain-d'huile et porté à 100—120° jusqu'à l'apparition de signes d'un commencement de réaction (fusion de la masse,

¹⁾ Synthese der α - δ -Diaminovaleriansäure: Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 454 (1901), Synthese der α - γ -Diaminobuttersäure: ibid. XXXIV, 2900 (1901), et E. Fischer & F. Weigert: Synthese der α - ϵ -Diaminocaprinsäure: Sitzungsber. der Berliner Akademie 1902, p. 270.

génération de vapeur). Alors, afin d'empêcher une trop grande élévation de température et une réaction trop violente, j'ai enlevé le matras du bain d'huile et, le matras ayant été agité à plusieurs reprises, l'opération s'est continuée sans afflux de chaleur du dehors. Lorsque la réaction parut terminée, ce que je pus facilement reconnaître à ce que le phtalimide potassique lamellaire était remplacé par le bromure de potassium granulé, j'ai chauffé, pour plus de sûreté, dans le bain d'huile pendant $1\frac{1}{2}$ heure environ, à une température de $130-140^{\circ}$. Après un refroidissement convenable, j'ai traité par l'eau au bain-marie l'ensemble des ingrédients et, de la sorte, fait dissoudre le bromure de potassium et l'excès de phtalimide potassique, tandis que l'éther phtalimidomalonique fondit et se laissa facilement, par l'eau chaude, entraîner hors du matras. Retiré des cinq matrass, le produit total de la réaction est resté deux heures couvert par la solution aqueuse de bromure de potassium, et par là s'est complètement pris en une masse solide. Pulvérisée, cette masse s'est laissée, sans difficulté, débarrasser de son brome par un lavage à l'eau froide. — Le rendement en éther phtalimidomalonique brut et séché à l'air, répondait presque au calcul (soit environ 590 gr. au lieu de 610 gr.).

Pour purifier le produit brut, qui était de couleur jaunâtre ou jaune-grisâtre et contenait toujours une petite dose de phtalimide, j'ai traité la matière séchée à l'air par environ 500 cc. de benzole, où l'éther phtalimidomalonique s'est dissous, tandis que la partie de beaucoup prépondérante du phtalimide est restée non dissoute. J'ai séparé ce reste en filtrant, et l'ai lavé avec 3×40 cc. de benzole; son poids à l'état sec était d'environ 40 gr. De la solution obtenue j'ai distillé le benzole, ce qui a laissé l'éther phtalimidomalonique sous forme d'huile jaunâtre, qui par le refroidissement s'est pris en une masse cristalline et qui, se dissolvant en 500—600 cc. d'alcool, a donné un liquide parfaitement clair. Le refroidissement de la solution alcoolique, produit en dernier lieu à l'aide d'eau glacée, a fait déposer l'éther phtalimidomalonique sous forme d'une belle masse cristalline blanche, où le microscope faisait voir surtout des prismes assez irréguliers et obliquement tronqués. J'ai filtré à l'aspirateur, et le produit, 3 fois lavé avec soin à l'alcool, est ainsi devenu parfaitement pur. Le rendement s'éleva à environ 400 gr.; mais de l'eau-mère et de l'alcool qui avait servi au la-

vage, je pus tirer, en chassant la majeure partie de l'alcool, puis refroidissant, un second produit, suivi d'un troisième produit obtenu d'une manière analogue. Leur poids total était d'environ 100 gr., de sorte que le rendement total de matière cristallisée de nouveau s'est élevé à plus de 80% de celui donné par le calcul. D'une part, le produit principal se montra toujours parfaitement pur; mais, de leur côté, les produits tirés de l'eau-mère contenaient ordinairement de très petites quantités de phtalimide, qu'on pouvait reconnaître soit par le dosage de l'azote (savoir de 4,67 à 4,71 % d'azote au lieu de 4,59 %), soit en déterminant le point de fusion; en faisant dissoudre dans le benzole et traitant comme on l'a fait plus haut, on pouvait évidemment en obtenir aussi un produit tout à fait pur.

L'analyse de préparations pures à l'état sec a donné les résultats que voici:

En dosant la quantité d'azote (opération pour laquelle ici comme dans tous les dosages d'azote dont parle ce mémoire, on a employé la méthode de Kjeldahl), 0,3507 grammes de la préparation A ont donné une quantité d'ammoniaque qui répondait à 16.38 centimètres cubes d'une solution d'hyposulfite ($0,9815 \times \frac{2}{14}$) (4,58% d'azote).

0^{gr},3690 de la préparation B équivalaient à 17^{cc},18 de la même solution d'hyposulfite (4,57 % d'azote).

0^{gr},4259 de la préparation C équivalaient à 19^{cc},62 d'une solution d'hyposulfite (norm. au $\frac{1}{14}$) (4,61 % d'azote).

0^{gr},3548 de la préparation D correspondaient à 16^{cc},30 de cette même solution (4,59 % d'azote).

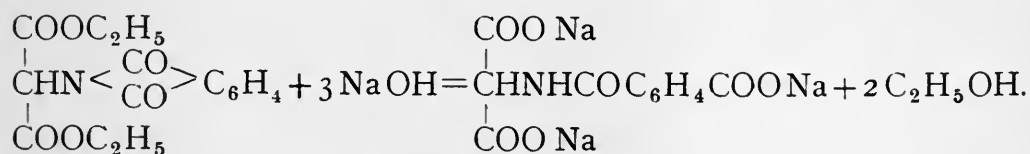
0^{gr},1907 de la préparation A ont donné 0^{gr},0824 d'eau (4,80 % d'hydrogène) et 0^{gr},4114 d'acide carbonique (58,84 % de carbone).

		Calculé	Trouvé				
C ₁₅	180	59.02	58.84				
H ₁₅	15	4.92	4.80				
O ₆	96	31.47					
N	14	4.59	4.58	4.57	4.61	4.59	
	305	100.00					

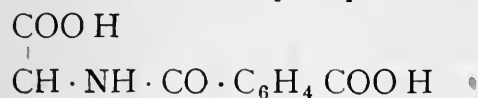
A l'état pur, l'éther phtalimidomalonique fond entre 73^o,8 et 74^o,0 (appareil de Roth). Cette substance se dissout très facilement dans le benzole, le chloroforme, l'éther acétique, l'acétone et l'alcool chaud; elle est un peu moins soluble dans le sulfure de carbone et dans l'éther; elle est assez peu soluble dans l'alcool froid, et elle se dissout très difficilement dans l'éther de pétrole et dans l'eau chaude; dans l'eau froide elle est insoluble.

Je vais terminer par quelques remarques relatives au procédé ci-dessus décrit pour la préparation de l'éther phtalimidomalonique pur. La principale impureté du produit brut étant le phtalimide, substance beaucoup moins soluble dans l'alcool chaud que l'éther phtalimidomalonique, on pourrait épurer celui-ci en traitant la matière brute par une quantité convenable d'alcool chaud, qui laisserait la plus grande partie du phtalimide non dissoute. Cependant cette opération ne mène pas au but; car en refroidissant la solution alcoolique, du phtalimide cristallise avec l'éther phtalimidomalonique, et l'on a beau renouveler la cristallisation de l'alcool, on ne peut pas abaisser la quantité d'azote notablement (4,85—4,90% d'azote). Dans un seul cas la recristallisation peut donner un produit parfaitement pur: quand la teneur de la masse en phtalimide est extrêmement petite, comme cela arrive par exemple quand on a traité le produit brut par le benzole d'après le procédé ci-dessus décrit; car alors tout le phtalimide reste dans l'eau-mère alcoolique.

On pourrait aussi chercher à éliminer le phtalimide de l'éther phtalimidomalonique en le traitant par une solution d'hydroxyde de sodium, le phtalimide se dissolvant facilement par ce liquide; cependant il est impossible d'opérer cette séparation; car, lui aussi, l'éther phtalimidomalonique se dissout avec une facilité extrême dans une solution même étendue d'hydroxyde de sodium, et cela à la température ambiante et d'après l'équation suivante:



En sursaturant légèrement d'acide chlorhydrique la solution obtenue, on fait précipiter l'acide tribasique correspondant:



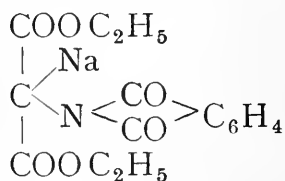
COOH , qui n'est guère soluble dans l'eau.

M. Jessen-Hansen, qui dans notre laboratoire s'occupe des synthèses des acides guanidés, a également rattaché à ces études celle de l'influence de la cyanamide sur cet acide et quelques-uns de ses dérivés. On trouvera donc dans un mémoire qui, on l'espère, ne tardera pas à sortir de ses mains, une description plus approfondie de cet acide et de ces propriétés.

Au moins la plus grande partie du phtalimide présent dans le produit brut, provenait de ce que l'éther bromomalonique contenait encore du bromure d'hydrogène; on pouvait donc en conclure que la préparation en question se ferait plus facilement si l'on distillait dans le vide l'éther bromomalonique avant de s'en servir. Or, on a constaté qu'à l'état brut l'éther phtalimido-malonique qu'on pouvait obtenir en employant l'éther bromomalonique distillé ne contenait qu'un peu de phtalimide; mais, comme il fut également impossible d'obtenir un produit parfaitement exempt de phtalimide en traitant ce produit brut par une simple recrystallisation dans l'alcool (la teneur en azote était de 4,66 %) et que, de plus, on ne pouvait éviter une perte en distillant l'éther bromomalonique, j'ai préféré la méthode précédemment décrite.

A l'état pur, préparé comme on l'a décrit plus haut, l'éther phtalimidomalonique a été lancé dans le commerce par C.-A.-F. Kahlbaum, de Berlin, au prix de 16 Reichsmark les 100 grammes.

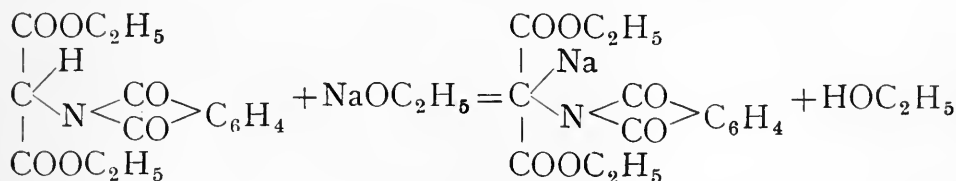
2. Éther phtalimidosodomalonique :



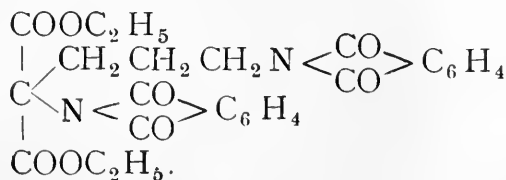
Ayant choisi un ballon de $\frac{1}{2}$ l. muni d'un réfrigérateur à reflux, dont l'extrémité supérieure porte un tube en U contenant du chlorure de calcium, on y dissout $\frac{1}{5}$ at. gr. (4^{gr},6) de sodium brillant dans 80—100 cent. cub. d'alcool absolu récemment distillé. La quantité totale de sodium étant dissoute, et la solution ayant encore une température de 60—70°, on y ajouta un peu plus de $\frac{1}{5}$ mol. gr. d'éther phtalimido-malonique (63 gr. au lieu de 61 gr.). En agitant avec précaution, et chauffant un peu au besoin, on obtint la dissolution de tout l'éther phtalimidomalonique, et le liquide brun jaunâtre ainsi obtenu ne tarda pas à déposer le phtalimidosodomalonnate d'éthyle sous forme de poudre jaune à gros cristaux. (Il est plus avantageux que la totalité de l'éther phtalimidomalonique soit dissoute avant que le composé de soude commence à se déposer; car autrement on risque de voir une partie de l'éther

phtalimidomalonique englobée dans la combinaison de sodium et soustraite de la sorte à l'action de l'alcoolat sodique.) La combinaison de sodium s'étant déposée, on avait une bouillie épaisse, d'où l'alcool était complètement éliminé par distillation dans le vide, en même temps que l'air pur et sec affluait au-dessus de la masse, mais pas à travers elle. On chauffait dans le bain d'huile, et au début on eut à procéder avec beaucoup de précaution pour empêcher une ébullition trop active; car la masse avait une tendance aux soubresauts; mais à la fin la température du bain se trouva entre 130 et 140°, et l'on jugea à propos d'écarter les dernières traces d'alcool en suspendant à plusieurs reprises l'aspiration et en insufflant dans le ballon de l'air sec et pur, puis en faisant de nouveau le vide. Sèche, la combinaison de sodium se présentait jaunâtre à éclat rougeâtre. En pesant le ballon, on pouvait contrôler la disparition de tout l'alcool.

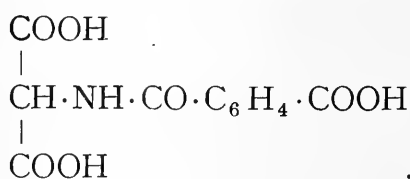
A l'état sec et exempt d'alcool, l'éther phtalimidosodomalonique fut aussitôt traité par la combinaison d'halogène en question, et me procura dans tous les cas que j'ai étudiés la réaction telle que je la désirais; mais il n'en fut pas ainsi quand j'ajoutais la combinaison d'halogène avant de distiller l'alcool, ou bien quand j'entreprenais de faire la réaction dans une solution alcoolique. La raison doit certainement en être que la transformation



est réciproque et n'a lieu complètement de gauche à droite que quand l'alcool est écarté par la distillation. Dans les premières expériences que j'ai faites, je ne connaissais pas encore cet état de choses, et c'est pourquoi je laissais la réaction se produire dans le liquide alcoolique; la combinaison d'halogène employée était le γ -bromopropylphtalimide, et comme produit de la réaction je m'étais en conséquence attendu à obtenir l'éther phtalimido- γ -phtalimidopropylmalonique décrit plus loin (voir page 34).



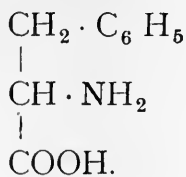
Toutefois on n'a pu isoler de la masse engendrée par cette réaction qu'environ 40% de la quantité à laquelle on avait estimé cette combinaison; le reste constituait une huile qu'on ne réussit pas à faire cristalliser et qui consistait probablement en un mélange d'éther phtalimidomalonique non transformé et de la combinaison $C_2H_5OCH_2CH_2CH_2N<\begin{smallmatrix} CO \\ CO \end{smallmatrix}>C_6H_4$, due à l'action de l'alcoolat de sodium sur le γ -bromopropylphtalimide, car le dédoublement par l'acide chlorhydrique donnait de la glycine (pesée et analysée sous forme d'acide hippurique) en proportion répondant approximativement à ce qu'on aurait pu attendre si l'huile avait contenu à l'état non transformé env. 60% de la quantité employée d'éther phtalimidomalonique. Dans une autre expérience la réaction se produisit entre l'éther phtalimidomalonique et le γ -bromopropylphtalimide en présence d'un excès notablement fort d'alcool (on employa $\frac{1}{10}$ mol. gr. des substances en question, soit la moitié des doses précitées et 300 cc. d'alcool); mais aussi le rendement se borna à 4—5 gr. d'éther phtalimido- γ -propylphtalimidomalonique, soit seulement env. 10% de la quantité calculée; le reste consistait en une huile qui sans doute contenait de l'éther phtalimidomalonique non transformé; car, traité par une solution d'hydroxyde de soude, et puis par l'acide chlorhydrique, il fournit une abondante quantité (qui pourtant ne répondait pas tout à fait au calcul) de l'acide tribasique susmentionné (p. 9):



L'autre élément de l'huile consiste-t-il réellement dans la combinaison $C_2H_5O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N<\begin{smallmatrix} CO \\ CO \end{smallmatrix}>C_6H_4$? je n'en ai fourni aucune preuve, mais les vraisemblances vont dans ce sens.

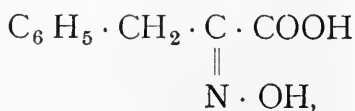
Parmi les nombreuses synthèses ayant pour point de départ l'éther malonique et effectuées sans production d'éther sodomalonique exempt d'alcool, on en trouve beaucoup qui sont loin de donner un rendement satisfaisant, et il est très probable qu'on pourrait modifier le résultat en effectuant la réaction sans alcool.

II. Phénylalanine :



Ce furent E. Schulze et J. Barbieri¹⁾ qui les premiers obtinrent la phénylalanine de germes de lupin étiolés, et tous les deux presque simultanément²⁾ en prouvèrent l'existence parmi les produits de la décomposition d'une substance protéique tirée de graines de citrouille, produits obtenus par ébullition avec l'étain et l'acide chlorhydrique. Voici quelque deux ans que, recourant au procédé Fischer³⁾ pour séparer les produits du dédoublement des protéines en fractionnant dans le vide les divers éthers, E. Fischer et ses collaborateurs ont signalé la phénylalanine comme produit constant de la décomposition de nombreuses et différentes substances protéiques⁴⁾ et par là appelé l'attention sur la place éminente occupée par la phénylalanine dans l'étude des substances protéiques.

La phénylalanine racémique fut déjà en 1882 préparée synthétiquement par E. Erlenmeyer et A. Lipp⁵⁾, qui prirent pour point de départ la phénylaldéhyde. Plus tard J. Plöchl⁶⁾ en fit autant en partant du produit de la condensation de l'acide hippurique et de la benzaldéhyde et profitant d'une réaction dont l'explication claire et complète est due aux travaux tout récents de E. Erlenmeyer jeune et J. Kunlin⁷⁾. Enfin, E. Erlenmeyer jeune⁸⁾ a préparé la phénylalanine soit en réduisant l'oxime de l'acide phénylpyruvique :



¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XII, 1924 (1879), XIV, 1785 (1881), et Journ. pr. Chem. [2] XXVII, 337 (1883).

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XVI, 1711 (1883).

³⁾ ibid. XXXIV, 433 (1901).

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. XXXIII, 151 (1901), XXXIII, 177 (1901), XXXIII, 412 (1901), XXXV, 70 (1902), et XXXVI, 268 (1902).

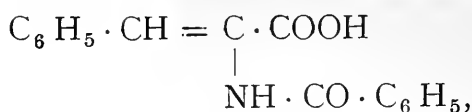
⁵⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XV, 1006 (1882), et Liebigs Ann. CCXIX, 187 (1883).

⁶⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XVII, 1623 (1884).

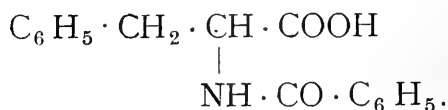
⁷⁾ Liebigs Ann. CCCVII, 146 (1899).

⁸⁾ ibid. CCLXXI, 169 (1892), et CCLXXV, 17 (1893).

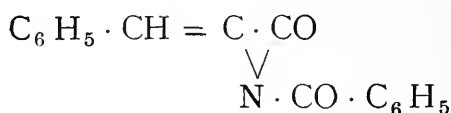
soit en réduisant l'acide benzoylaminocinnamique



et dédoublant par l'acide chlorhydrique la benzoyle-phénylalanine formée :

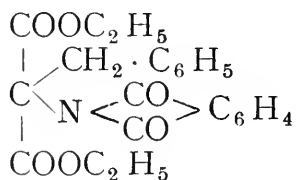


Comme l'acide benzoylaminocinnamique est assez facile à obtenir par la condensation de l'acide hippurique avec la benzaldéhyde en présence de l'acétate de soude et de l'acide acétique anhydre, si l'on dissout le produit de cette condensation :



dans une solution d'hydroxyde de soude, et qu'ensuite on précipite par l'acide chlorhydrique, — ce dernier moyen constitue le plus commode des procédés jusqu'ici connus pour préparer la phénylalanine racémique, et E. Fischer et A. Mouneyrat¹⁾ s'en sont servis avec avantage en dédoublant la benzoyle-phénylalanine racémique en ses composants actifs. Cependant le procédé ci-dessous décrit, déjà esquissé dans l'introduction à ce mémoire, donne un excellent rendement et me paraît tout aussi simple, depuis que l'éther phtalimidomalonique est devenu article de commerce.

1. Éther benzylphtalimidomalonique :



Dans un ballon d' $1\frac{1}{2}$ l. muni d'un tube réfrigérant à reflux, au haut duquel était installé un tube en U chargé de chlorure de calcium, on traita dans le bain d'huile et entre 150 et

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIII, 2383 (1900).

160°¹) $\frac{1}{5}$ mol. gr. d'éther phtalimidosodomalonique (voir p. 10) par 40 gr. de chlorure de benzyle (calculé 25^{gr},3). Au bout de deux heures de chauffage, la réaction était assez avancée pour qu'on pût réduire en morceaux en l'agitant la croûte de composé sodique, et quand on eut chauffé pendant 6 heures en répétant l'agitation, on vit le tout former une masse presque gélatineuse, assez pâteuse et mêlée de chlorure de sodium, qui n'avait plus de réaction alcaline sur le papier curcuma humide. L'excès de chlorure de benzyle fut ensuite séparé par distillation à la vapeur, et le résidu, huile jaune, fut mêlé d'eau chaude et versé dans une capsule, où il ne tarda pas à se figer en cristaux. La masse cristalline, un peu plastique, fut pilée et, une fois bien refroidie, filtrée et purgée de chlore par un lavage à l'eau froide; le rendement en produit séché à l'air répondit au calcul.

Pour purifier le produit brut, on en fit une dissolution dans 200 cc. d'alcool chaud; on en sépara par filtration quelques flocons non dissous, et qu'on lava par 2×20 cc. d'alcool chaud. En refroidissant bien la solution alcoolique obtenue, et remuant fréquemment, on fit déposer la matière sous forme de précipité cristallin d'un blanc pur, où le microscope révéla de belles aiguilles incolores, dont quelques-unes étaient assez grandes pour présenter des prismes tétraédriques, parfois combinés avec une pyramide quadrangulaire²). La masse cristalline fut filtrée à l'aspirateur, puis trois fois lavée par aspiration avec une quantité totale de 200 cc. d'alcool refroidi à la glace. Le rendement du premier produit fut d'environ 56 gr.; mais après avoir enlevé par distillation la majeure partie de l'alcool, on put encore retirer de l'eau-mère et de la rinçure alcoolique 7 à 8 gr., ce qui porta le rendement total à près de 80% du calculé; des expériences où j'ai opéré à mi-dose, m'ont pourtant rendu un peu moins, soit 70—75% du produit calculé.

Voici le résultat de l'analyse des préparations séchées à l'air:

0^{gr},5269 de la préparation A (premier produit) donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 18^{cc},44 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (3,50% d'azote).

¹) La réaction se manifeste déjà entre 135 et 140° dans le bain d'huile, mais elle est assez lente.

²) Recristallisé dans une grande quantité d'alcool lentement refroidi, le composé se déposa sous forme de beaux prismes tétraédriques et à 4 pans, ordinairement obliquement tronqués.

0^{gr},3710 de la préparation B (premier produit) répondaient à 12^{cc},85 de la même solution d'hyposulfite (3,46⁰/o d'azote).

0^{gr},4350 de la préparation C (second produit) répondaient à 15^{cc},00 de cette même solution (3,45⁰/o d'azote).

0^{gr},2090 de la préparation B donnèrent 0^{gr},0981 d'eau (5,22⁰/o d'hydrogène) et 0^{gr},5108 d'acide carbonique (66,65⁰/o de carbone).

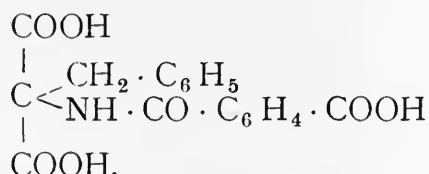
		Calculé	Trouvé		
C ₂₂	264	66,84		66,65	
H ₂₁	21	5,32		5,22	
O ₆	96	24,30			
N	14	3,54	3,50	3,46	3,45
		395	100,00		

Dans l'appareil Roth l'éther benzylphthalimidomalonique fond entre 105 et 106⁰; mais il se contracte déjà à quelques degrés au-dessous. Le composé est très soluble dans le chloroforme, le benzol et l'alcool chaud, assez soluble dans l'éther, peu soluble dans l'alcool froid et l'éther pétroléique chaud, très peu soluble dans cet éther froid, presque insoluble dans l'eau chaude, et insoluble dans l'eau froide.

Si l'on traite l'éther benzylphthalimidomalonique par une forte dose d'acide chlorhydrique ou de bromure d'hydrogène, la combinaison se dissoudra petit à petit en se dédoublant; mais la dissolution est très lente, surtout à une température assez haute pour fondre l'éther. Le dédoublement se produit beaucoup plus aisément si, scindant l'opération, l'on commence par traiter la combinaison par une solution d'hydroxyde de sodium, qui la transforme en sel de soude de l'acide phtalamique-benzylmalonique tribasique, et qu'ensuite on dédouble cet acide en le chauffant avec de l'acide chlorhydrique (voir les réactions p. 3). Ces deux transformations se produisent avec une extrême facilité, et quand on prépare la phénylalanine, il n'est pas nécessaire de préparer à l'état de pureté le susdit acide tribasique, qui est presque insoluble dans l'acide chlorhydrique faible, mais est au contraire assez soluble dans l'eau froide. Il suffit parfaitement de précipiter, par un léger excès d'acide chlorhydrique, l'acide tribasique de la solution obtenue en traitant par une lessive de soude l'éther benzylphthalimidomalonique, après quoi l'on fait avec l'aspirateur plusieurs lavages à l'acide chlorhydrique étendu, et le purge ainsi de son sel de cuisine. De la sorte on ne perd pour ainsi dire rien et, terminant par un bain d'eau,

l'on décompose l'acide par l'acide chlorhydrique étendu (voir d'ailleurs ce qui se passe durant la préparation de la phénylalanine, p. 19).

2. Acide phtalamique-benzylmalonique tribasique:



Pour le préparer à l'état pur, on a traité $\frac{1}{20}$ mol. gr. (19^{gr},7) d'éther benzyl-phtalimidomalonique par 50 cc. de lessive de soude 5-norm., au bain-marie, dans un petit matras conique. Ayant chauffé durant 1 heure ou 1 $\frac{1}{2}$, on constata le dédoublement complet de la combinaison primitive et, au lieu de la masse volumineuse de l'éther employé, on trouva un précipité granulé cristallin du sel sodique de l'acide, précipité peu soluble dans la solution concentrée d'hydroxyde de sodium, mais assez soluble dans l'eau. Il était donc aisé de décider si la réaction était terminée ou non; pour cela, il suffisait d'essayer si un échantillon dudit précipité donnait dans l'eau une solution claire ou louche. La transformation achevée, on refroidit, en terminant à l'eau de glace, après quoi on ajouta de la glace et neutralisa par l'acide chlorhydrique norm. frappé; puis on enleva par filtration les flocons non dissous. Le liquide fut refroidi à la glace en remuant, et précipité en y versant petit à petit 50 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal frappé à la glace; puis on ajouta encore 50 cc. d'acide chlorhydrique concentré. Grâce à cette opération la majeure partie de l'acide en question se déposa sous la forme d'une masse huileuse qui, séjournant dans l'eau-mère et refroidie à l'eau de glace durant deux heures, se figea en cristaux. En même temps une petite quantité se déposa dans l'eau-mère sous forme de cristaux aciculés, où un fort grossissement fit voir des prismes à 4 pans bien développés. On mit la croûte cristalline dans un mortier et la pulvérisa; le produit fut filtré et délivré de son sel de cuisine par un quintuple lavage à l'aspirateur avec de l'acide chlorhydrique 2-norm., ce qui n'emporta que très peu de l'acide; maintenant l'acide put servir directement à préparer la phénylalanine (voir p. 19); il va de soi qu'en préparant l'acide pur on

dut le laver ultérieurement à l'eau frappée pour lui enlever l'acide chlorhydrique. On obtint 13^{gr},7 d'acide séché à l'air; mais le liquide de lavage (env. 400 cc.) traité par 130 cc. d'acide chlorhydrique concentré et refroidi à la glace, donna un second produit qui, dûment lavé à l'eau, devint pur et qui, séché à l'air, pesait 1^{gr},0; le rendement total fut donc 82 % du calculé.

Voici le résultat de l'analyse des préparations séchées à l'air:

0^{gr},3053 de la préparation A (premier produit) donnèrent par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 12^{cc},05 d'une solution d'hyposulfite de sodium norm. au 1/14 (3,95 % d'azote).

0^{gr},2334 de la préparation B (premier produit) répondaient à 9^{cc},15 de cette solution (3,92 % d'azote).

0^{gr},3505 de la préparation C (second produit) répondaient à 13^{cc},75 de cette même solution (3,92 % d'azote).

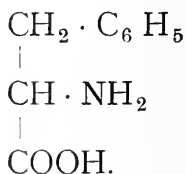
0^{gr},1931 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0738 d'eau (4,25 % d'hydrogène) et 0^{gr},4294 d'acide carbonique (60,64 % de carbone).

		Calculé	Trouvé		
C ₁₈	216	60,50	60,64		
H ₁₅	15	4,20	4,25		
O ₇	112	31,38			
N	14	3,92	3,95	3,92	3,92
357		100,00			

Enfin, 0^{gr},1903 de la préparation B, titrés par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 × norm.), en exigèrent 16^{cc},00; calculé à 16^{cc},06.

Chauffé rapidement dans un tube capillaire au bain de glycérine¹⁾, l'acide fond en dégageant de l'air entre 160° et 165°.

3. Phénylalanine :



0^{mol} gr,1 (39^{gr},5) d'éther benzyl-phtalimidomalonique ayant été transformé par le procédé ci-dessus (voir p. 17) en acide

¹⁾ Ici comme dans les cas suivants, cette opération comprend un chauffage, qui tient durant quelques instants, à une vingtaine de degrés au-dessous du point de fusion, puis une élévation de température d'env. 10° par minute.

phtalamique-benzylmalonique tribasique, qu'on lave d'abord avec de l'acide chlorhydrique 2-normal, et ensuite avec le jet d'une pissette on fait passer le précipité dans un ballon (de 1½ litre), en employant env. ½ l. d'eau; on y ajoute 50 cc. d'acide chlorhydrique concentré. On place le ballon au bain-marie bouillant, et obtient peu à peu, avec dégagement d'acide carbonique, une solution parfaitement claire. Quand on a chauffé pendant deux heures, on ajoute 300 cc. d'acide chlorhydrique concentré, qui ne produisent plus de précipité, et l'on poursuit le chauffage durant une heure pour parfaire la réaction. Puis le liquide est évaporé dans une capsule en porcelaine au bain-marie jusqu'à consistance d'une bouillie assez épaisse. On refroidit à l'eau de glace, puis extrait du produit obtenu le chlorhydrate de phénylalanine, par une quantité aussi faible que possible d'eau refroidie à zéro. L'acide phtalique qui restait subit alors un quintuple lavage avec une quantité d'eau à la glace mesurant 150 cc. en tout, ce qui le laissait presque absolument exempt de chlore et lui donnait à l'état sec un poids de 14 gr. (env. 84 % des 16^{gr},6 calculés). La solution de phénylalanine chlorhydrique ayant été additionnée de 60 cc. d'eau ammoniacale 5-normale, en rendait manifestement l'odeur. Évaporé dans une large¹⁾ capsule de porcelaine, elle passa à l'état de bouillie épaisse, qu'on refroidit, puis traite par 100 cc. d'eau frappée à la glace, en écrasant bien les grumeaux qui pourraient s'y présenter. Ayant ainsi fait dissoudre le chlorure d'ammonium, on fit passer sur un filtre la phénylalanine et lava à l'aspirateur avec de l'eau frappée. On en tira 11 gr. de phénylalanine séchée à l'air; mais en évaporant les eaux-mères et traitant le résidu comme ci-dessus, on obtint un second produit qui, sec, pesait env. 3 gr., en sorte que le rendement complet dépassait les 80 % du résultat calculé. La phénylalanine brute était pure à très peu près; on acheva de la purifier en la dissolvant dans l'eau chaude, la débarrassant, chaude encore, d'une trace d'hydroxyde de fer dû à l'acide chlorhydrique employé, puis évaporant le liquide filtré jusqu'à cristallisation. Le refroidissement donna de beaux cristaux de phénylalanine en feuilles fines à éclat soyeux, qu'on sépara par filtration, lava à l'eau froide et qui, séchés à l'air, pesaient 9 gr. L'eau-mère et celle du lavage

¹⁾ Puisque le sel ammoniac grimpe le long des parois.

rendirent encore 3^{gr},5 par une évaporation ultérieure analogue, et le reste put être retiré, bien qu'un peu moins pur, en évaporant à siccité l'eau-mère, ou en précipitant par l'acétate de cuivre la solution de phénylalanine.

L'analyse des préparations séchées a l'air donna le résultat suivant:

0^{gr},2278 de la préparation A (premier produit) donnèrent par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque correspondant à 19^{cc},35 d'une solution d'hyposulfite norm. au 1/14 (8,49 % d'azote).

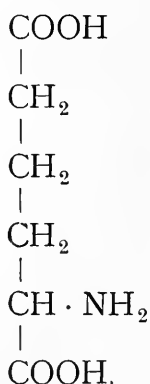
0^{gr},2890 de la préparation B (second produit) répondaient à 24^{cc},50 de la même solution d'hyposulfite (8,48 % d'azote).

0^{gr},1584 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0935 d'eau (6,56 % d'hydrogène) et 0^{gr},3805 d'acide carbonique (65,51 % de carbone).

		Calculé	Trouvé	
C ₉	108	65,45	65,51	
H ₁₁	11	6,67	6,56	
O ₂	32	19,39		
N	14	8,49	8,49	8,48
165		100,00		

Chauffés rapidement dans des tubes capillaires, les deux produits ci-dessus, après s'être contractés, fondirent un peu au-dessus de 270° (corr.) (entre 271° et 273°), en dégageant beaucoup d'air.

III. Acide α -aminoadipique:



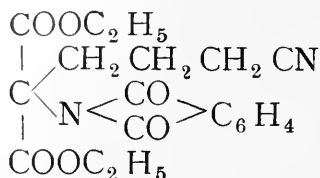
Dans un des travaux sur les décompositions des protéines par lesquels il a ouvert la voie, A. Kossel¹⁾ englobe dans la

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. XXV, 175 (1898).

dénomination commune d'*hexones* les quatre produits importants de ces décompositions ayant six atomes de carbone en une molécule: leucine ($C_6 H_{13} NO_2$), lysine ($C_6 H_{14} N_2 O_2$), histidine ($C_6 H_9 N_3 O_2$) et arginine ($C_6 H_{14} N_4 O_2$), et désigne du terme commun de *bases hexoniques* les trois dernières de ces substances (arginine, histidine et lysine), dont le caractère basique est prononcé. Kossel assigne à ces hexones, parmi les produits de la décomposition des protéines, une place importante analogue à celle qu'occupent les hexoses parmi les produits du dédoublement des polysaccharides, et il établit certains parallèles très justes entre les substances protéiques et les hexones d'une part, et les polysaccharides et les hexoses d'autre part. En terminant, il fait aussi remarquer combien il serait intéressant de pouvoir prouver qu'à l'instar des hexoses, les hexones renferment six atomes de carbone liés entre eux par séries. Sur ce dernier point cependant, il me semble que les hexones et hexoses se ressemblent peu; car ni la leucine ni l'arginine n'ont six atomes combinés entre eux par série; la constitution de l'histidine est tout à fait inconnue, et la lysine seule peut être supposée avoir ses atomes de carbone disposés comme dans les hexoses. Abstraction faite de cela, je ne sache pas qu'en somme on ait donné une preuve solide que dans les produits de la décomposition des protéines les atomes de carbone présenteraient des combinaisons par séries de six. C'est ainsi que, si d'une part la leucine (acide α -aminoisobutylacétique) se trouve, comme nous l'avons vu plus haut, parmi les plus importants produits de la décomposition protéique, l'acide aminocaproïque normal n'a jamais encore été découvert en dédoublant les substances protéiques, et tandis que les acides asparaginique et glutaminique appartiennent aux produits de décomposition les plus fréquemment rencontrés et connus depuis le plus longtemps, on ignore complètement l'acide α -aminoadipique qui devrait former le composé analogue. J'ai donc pensé qu'il pourrait y avoir intérêt à découvrir les propriétés de cet acide, facile à obtenir d'après le procédé ci-dessous, déjà décrit sommairement dans l'introduction de ce mémoire. Parmi ces propriétés, on se contentera de mentionner ici qu'il est considérablement moins soluble dans l'eau que les acides asparaginique et glutaminique racémiques, et si l'on peut s'attendre à ce qu'à l'instar des acides asparaginique et glutaminique, les modifications optiquement actives

sont moins solubles que le type racémique correspondant, il est probable qu'on n'aura guère de peine à décider si l'acide α -aminoadipique se trouve ou manque parmi les produits de la décomposition des protéines.

1. Éther butyronitrile-phtalimidomalonique.



Dans un ballon d' $1\frac{1}{2}$ litre, muni d'un tube réfrigérant à reflux surmonté d'un tube en U contenant du chlorure de calcium, on traita dans le bain d'huile, à env. 160° , $\frac{1}{5}$ mol. gr. d'éther phtalimido-sodomalonique (v. p. 10) par 40 gr. de γ -chlorobutyronitrile¹⁾ (calculé 21 gr.). Cette masse ayant été chauffée durant $\frac{1}{2}$ —1 heure, donna des signes de modification; mais elle était encore très pâteuse et, pour l'amener à une parfaite fluidité, il fallut la chauffer pendant aussi longtemps et l'agiter à diverses reprises, ce qui n'en laissa pas moins çà et là de petits grumeaux de la composition sodique isolés et échappant à la réaction. Un échantillon qu'on en leva brunit fortement le papier curcuma humide. Pour atteindre la réaction neutre, il fallut chauffer ultérieurement pendant 3 ou 4 heures, entre 160 et 165° ²⁾. — L'excès de γ -chlorobutyronitrile fut ensuite enlevé par distillation à la vapeur d'eau, et l'huile jaune qui resta, fut transvasée avec de l'eau chaude dans une capsule, où elle ne tarda pas à se figer en cristaux. Complètement refroidie, la croûte cristalline fut pulvérisée, puis filtrée à l'aspirateur, et enfin lavée à l'eau froide pour enlever le chlore. Le rendement en produit sec répondit au calcul.

Pour la purification, le produit brut fut dissous en 200 cc. d'alcool chaud; par filtration on le débarrassa de quelques flocons non dissous, qui furent lavés avec 3×15 cc. d'alcool

¹⁾ S. Gabriel: Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXIII, 1771 (1890).

²⁾ L'emploi d'une température d'un peu plus de 180° a exercé une influence accélérante sur la réaction, de sorte qu'alors celle-ci s'est terminée plus vite; mais, en retour, le rendement fut moins bon, et la matière un peu colorée, même après une nouvelle cristallisation.

chaud. En refroidissant, en dernier lieu à l'eau glacée, la solution alcoolique ainsi obtenue, et en remuant fréquemment, on vit la nitrile se déposer sous forme d'un beau précipité blanc, à grains cristallins, dont le microscope révélait l'aspect très irrégulier: un mélange de types lamelleux, entremêlés de combinaisons en pyramides et prismes bien définis, bien qu'en général les formes fussent fragmentaires. La masse cristalline fut séparée de l'eau-mère par aspiration, puis lavée trois fois à l'aspirateur avec de l'alcool refroidi à la glace. Le premier produit donna un rendement de 54—56 gr.; mais en évaporant jusqu'à un petit volume l'eau-mère et l'alcool de lavage, on obtint encore 4 à 6 gr., en sorte que le rendement total fut environ 80 % de la quantité calculée¹⁾; pourtant, des expériences où je n'opérais qu'à mi-doses, m'ont donné un rendement un peu moindre, savoir 70—75 % de la quantité calculée.

Voici le résultat de l'analyse des préparations séchées à l'air:

0^{gr},1567 de la préparation A (premier produit) donnèrent au dosage de l'azote, une quantité d'ammoniaque répondant à 11^{cc},88 d'une dissolution d'hyposulfite de sodium norm. au $\frac{1}{14}$ (7,58 % d'azote).

0^{gr},2463 de la préparation B (premier produit) répondaient à 18^{cc},74 de la même solution d'hyposulfite (7,61 % d'azote).

0^{gr},3274 de la préparation C (second produit) répondaient à 24^{cc},96 de la même solution d'hyposulfite (7,62 % d'azote).

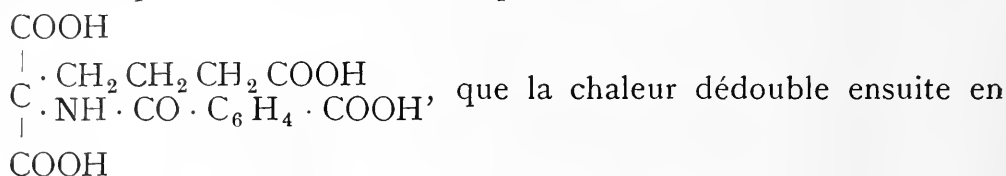
0^{gr},1950 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0981 d'eau (5,59 % d'hydrogène) et 0^{gr},4397 d'acide carbonique (61,49 % de carbone).

		Calculé	Trouvé		
C ₁₉	228	61,29	61,49		
H ₂₀	20	5,38	5,59		
O ₆	96	25,80			
N ₂	28	7,53	7,58	7,61	7,62
372		100,00			

¹⁾ Après cette opération, l'eau-mère contenait encore une certaine proportion de nitrile; c'est ce qu'on a observé en éliminant par distillation l'alcool et préparant de l'huile restante l'acide α -aminoadipique, par le procédé décrit dans la suite. C'est ainsi que de 46 gr. d'huile (petites quantités formant les restes de différentes préparations de nitrile) j'ai obtenu 6,8 gr. d'acide α -aminoadipique brut qui, après décoloration de sa solution faiblement acidulée par l'acide chlorhydrique au moyen du noir animal, m'ont donné 5 gr. d'acide cristallisé de nouveau et pur; 46 gr. de nitrile pure correspondent à env. 20 gr. d'acide α -aminoadipique.

Dans l'appareil de Roth la nitrile fond à 91°. Elle est très soluble dans le benzol, le chloroforme, l'acétone, l'éther acétique et l'alcool chaud, assez soluble dans l'éther et l'acide acétique glacial, peu soluble dans l'alcool froid, très peu soluble dans l'éther de pétrole et dans l'eau chaude, et insoluble dans l'eau froide.

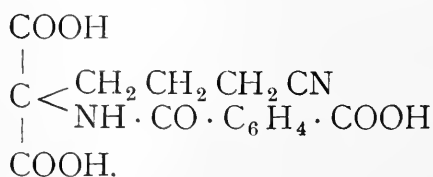
La nitrile se laisse bien scinder par un traitement à l'acide chlorhydrique concentré; mais la réaction n'est que faible à des températures inférieures au point de fusion de la nitrile, et à des températures supérieures, il faut fréquemment secouer pour que l'acide chlorhydrique attaque volontiers la nitrile fondue. La scission a lieu bien plus facilement quand on dissout d'abord la nitrile dans une solution d'hydroxyde de sodium, donnant un sel sodique de l'acide tétrabasique:



présence de l'acide chlorhydrique (voir les réactions p. 4). Ces deux réactions sont presque spontanées, et il devient superflu de précipiter, encore moins est-il nécessaire de préparer pur le susdit acide tétrabasique: la solution du sel sodique peut être directement sursaturée d'acide chlorhydrique; car, comme la suite le fera ressortir, on réussit aisément à séparer l'acide α -aminoadipique du chlorure de sodium qui s'est formé en même temps.

2. Acide α -aminoadipique.

Dans une grande capsule de porcelaine on fit dissoudre $\frac{1}{20}$ mol. gr. (18 gr,6) d'éther butyronitrile-phthalimidomalonique en le chauffant au bain-marie avec 100 cc. d'alcool. A la solution chaude on ajouta par portions une solution chaude de $\frac{2}{5}$ mol. gr. (16 gr.) d'hydroxyde de sodium dans 100 cc. d'eau. En ajoutant le premier quart de cette solution d'hydroxyde de sodium, l'on vit se former presque instantanément un précipité peu soluble dans l'alcool, mais bien soluble dans l'eau et constituant probablement le sel sodique de l'acide

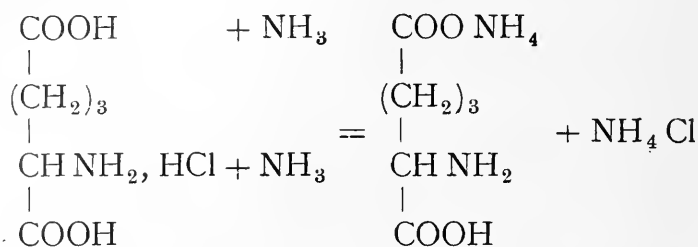


Lorsque, au bout de quelques minutes, on ajouta le reste de la solution d'hydroxyde sodique, tout fut dissous et donna un liquide limpide. Un chauffage ultérieur au bain-marie ne tarda pas à donner un vif dégagement d'ammoniaque. En prolongeant ce chauffage durant 2 heures et ajoutant plusieurs fois de l'eau pour maintenir constamment le volume à environ 200 cc., on fit presque disparaître l'odeur d'ammoniaque. Ensuite on versa cette solution dans un matras, avec addition de 150 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et remit le tout au bain-marie, où il resta deux ou trois heures, pendant lesquelles on nota un vif dégagement d'acide carbonique. Puis on évapora la solution au bain-marie dans une capsule en porcelaine jusqu'à consistance de bouillie claire et, tout en refroidissant à la glace, on traita par 100 cc. d'acide chlorhydrique au titre d'env. 33 % (soit 4 volumes d'acide concentré et 1 volume d'eau). A ce degré de concentration, cet acide ne dissolvait que fort peu de chlorure de sodium et d'acide phtalique, mais il dissolvait très facilement le chlorhydrate de l'acide α -aminoadipique, et il fut possible d'effectuer à l'aspirateur la filtration de cette solution à travers deux couches de papier durci sans que celui-ci éclatât. Après avoir bien refroidi à la glace, on sépara par filtration le chlorure de sodium et l'acide phtalique, et le précipité subit sur filtre des lavages réitérés à l'acide chlorhydrique titrant environ 33 % et refroidi à la glace¹⁾.

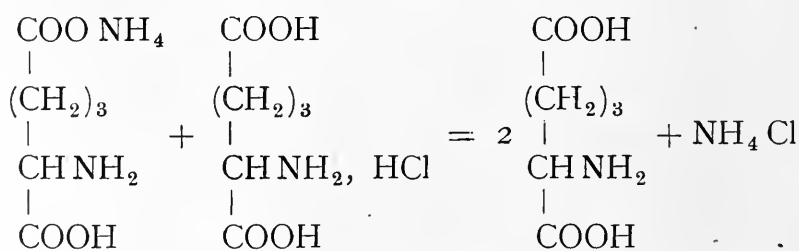
La solution évaporée au bain-marie forma au liquide jaune huileux, qu'on mit, dans un exsiccateur, sur de l'acide sulfurique concentré et de l'hydroxyde solide de potassium. Le lendemain l'huile était entièrement figée en une masse cristalline qui, pulvérisée dans la capsule, sentait encore fortement l'acide chlorhydrique; mais, abandonnée pendant 3 jours encore à l'influence de l'acide sulfurique et de l'hydroxyde de potassium et fréquemment remuée, elle perdit cette odeur. Alors on en fit à froid une dissolution aqueuse, dont on sépara par filtration une petite quantité d'acide phtalique non dissous. On fit deux parts égales de cette solution mesurant en tout 80 cc. et qui, en sus du

¹⁾ Le mélange de chlorure de sodium avec de l'acide phtalique a été traité par l'eau froide, et l'acide phtalique restant pesait, purgé de chlore et séché à l'air, 7 gr,4 (calculé 8 gr,3); il ne contenait que 0,05 milligramme d'azote par gramme, ce qui montrait que la décomposition de la nitrile avait été complète.

chlorhydrate de l'acide α -aminoadipique devait contenir un peu de chlorure de sodium, un peu d'acide phtalique et vraisemblablement un peu d'acide chlorhydrique. La première part consommée pour la neutralisation 11 cc. d'eau ammoniacale 5-norm., d'où résulta d'abord une précipitation de l'acide α -aminoadipique qui se dissolvait de nouveau par l'addition des derniers centimètres cubes d'eau ammoniacale. La quantité d'ammoniaque calculée d'après l'équation



est de 10 cc. d'eau ammoniacale 5 norm., en sorte que cette moitié de la solution renferme encore une dose d'acides phtalique et chlorhydrique répondant à environ 1 cc. d'eau ammoniacale 5-norm. L'autre moitié fut donc additionnée de 1 cc. d'eau ammoniacale 5 norm. pour neutraliser ce qu'elle pouvait contenir d'acides chlorhydrique et phtalique libres; puis on mêla les deux moitiés. Le liquide, dont la température était d'environ 30°, fut remué et ne tarda pas à déposer l'acide α -aminoadipique en cristaux lamellés et incolores; car



Reposé jusqu'au lendemain, le liquide fut filtré à l'aspirateur, et le précipité purgé de chlore en lavant à l'eau froide. On en obtint de 6^{gr},3 à 6^{gr},8 d'acide sec.

En évaporant au bain-marie l'eau-mère et l'eau de lavage à petit volume, et en laissant reposer ensuite pour faire cristalliser, on put bien en obtenir encore une petite quantité; mais, comme on le fera remarquer dans la suite, on constata que cette méthode ne s'y prêtait pas. On vit qu'il valait mieux évaporer la solution additionnée d'un léger excès d'hydroxyde de sodium

pour chasser l'ammoniaque, puis évaporer avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à consistance de bouillie claire, épuisant cette bouillie avec de l'acide chlorhydrique à 33 %, et terminant tout comme ci-dessus. Cette manipulation permet de recueillir de l'eau-mère et du liquide de lavage $\frac{1}{2}$ à 1 gr. d'acide α -aminoadipique, ce qui porta le rendement total à 90 % du rendement calculé.

L'acide obtenu était presque parfaitement pur; celui que donna l'eau-mère avait pourtant une certaine teinte jaunâtre; mais pour l'un et l'autre produit le point de fusion et la teneur en azote les rapprochaient beaucoup de l'acide pur.

En faisant recristalliser l'acide, il faut bien remarquer deux circonstances:

1° Après un chauffage prolongé ou même une évaporation de la solution aqueuse, celle-ci déposera peu ou point de nouveaux cristaux;

2° selon la température, l'acide peut cristalliser avec différentes quantités d'eau de cristallisation, à savoir à 0°, avec 1 molécule à peu près, tandis qu'au-dessus de 20° env. il est exempt d'eau et qu'aux températures intermédiaires on obtient un mélange des deux modifications.

Voilà pourquoi l'eau chaude ne se prête pas à la recristallisation de l'acide: même en limitant au strict nécessaire le chauffage au bain-marie, la solution renferme après le refroidissement plus que la petite quantité qui correspond à la solubilité dans l'eau froide (v. p. 31). Ainsi, 3 gr. d'acide anhydre étant dissous en 100 cc. d'eau chaude et cette solution refroidie à la glace, on n'obtint que 2^{gr},26 d'acide hydraté, répondant à environ 2 gr. d'acide anhydre. Cet état de choses se manifesta nettement dans une expérience où 3 gr. d'acide α -aminoadipique brut, retiré de divers produits secondaires et par suite un peu coloré, furent dissous en un litre d'eau bouillante et chauffés au bain-marie avec du noir animal, après quoi on filtra la solution, l'évapora jusqu'à env. 100 cc. et la laissa cristalliser, ce qui ne donna que 0^{gr},5 (au vrai point de fusion et avec la vraie teneur en azote: 0^{gr},2100 répondaient à 18^{cc},13 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [8,63 % d'azote, calculé à 8,70 %]). Additionnée d'alcool à volume égal et reposée jusqu'au lendemain, l'eau-mère fit encore tomber 0^{gr},22 (au vrai point de fusion et ayant la vraie teneur en azote: 0^{gr},2005 répondaient à 17^{cc},41 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [8,68 % d'azote]). L'eau-mère qui resta fut évaporée au bain-

marie et laissa un liquide presque huileux, que le refroidissement figea en une masse à cristaux mal définis. En lavant cette dernière à plusieurs reprises à l'eau froide sur un filtre, on obtint la dissolution de presque tout, et il ne resta que 0^{gr},2 plus riches en azote qu'on ne l'avait calculé pour l'acide α -aminoadipique anhydre (0^{gr},1726 répondaient à 15^{cc},68 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [soit 9,08 % d'azote, calculé à 8,70 %]). Enfin la dernière solution aqueuse obtenue, mélangée d'acide chlorhydrique, fut évaporée au bain-marie et, suivant le procédé décrit plus haut, on tira du chlorhydrate obtenu 1^{gr},3 d'acide α -aminoadipique pur et anhydre (0^{gr},2108 répondaient à 18^{cc},25 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [8,66 % d'azote]). La cause de ce fait n'est pas indiquée par les expériences ci-dessus mentionnés; mais la vraisemblance et surtout la richesse en azote de la substance évaporée à siccité au bain-marie, parlent en faveur d'une formation d'anhydride dans la solution aqueuse chaude.

Le meilleur moyen de faire recristalliser l'acide α -aminoadipique est de le dissoudre dans l'eau ammoniacale ou dans l'acide chlorhydrique à un titre connu, après quoi l'on précipite de nouveau en ajoutant des doses proportionnées respectivement d'acide chlorhydrique ou d'eau ammoniacale. Dans ce cas, l'acide se précipite de nouveau et presque en entier; et l'on n'en perd que la partie dissoute par le lavage à l'eau froide, et si pour ce lavage on emploie de l'eau saturée à froid de cet acide, le rendement sera presque de 100 %, comme le feront ressortir les expériences ci-dessous.

L'acide hydraté se conservait à l'air, mais il perdait toute son eau, lentement dans le vide et sur l'acide sulfurique, rapidement dans le vide à 70—75°, pour la reprendre complètement à l'air humide à la température ordinaire. L'acide anhydre ne changeait pas de poids dans le vide à 70—75°, ni à l'humidité à la température ordinaire, et finalement, un acide cristallisé entre 10 et 15° se comportait comme un mélange d'acide anhydre et d'acide hydraté. En faisant recristalliser dans l'eau ou dans l'eau ammoniacale + l'acide chlorhydrique ou dans l'acide chlorhydrique + l'eau ammoniacale, on put transformer l'acide anhydre en hydraté, et réciproquement.

Expérience N° 1. 1 gr. d'acide anhydre étant dissous au bain-marie dans 40 cc. d'eau bouillante, la solution fut rapidement refroidie à l'eau frappée, ce qui fit tomber 0^{gr},80 d'acide hydraté, répondant à environ 0^{gr},72 d'acide anhydre.

0^{gr},4097 perdirent 0^{gr},0426 en 12 heures dans le vide à 70—75° (soit 10,40 %; 1 mol. d'eau répond à 10,06 %); en prolongeant la dessiccation, il n'y eut aucune perte; un séjour subséquent à l'humidité pendant 16 heures fit réabsorber 0^{gr},0427, et ensuite une exposition ultérieure ni à humidité, ni à l'air, ne changea rien au poids.

0^{gr},2009 donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},55 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (7,74 % d'azote, calculé pour 1 mol. d'eau: 7,82 %).

0^{gr},1895 donnèrent 0^{gr},1268 d'eau (7,44 % d'hydrogène) et 0^{gr},2799 d'acide carbonique (40,26 % de carbone).

Expérience N° 2. 1 gr. d'acide hydraté fut dissous, bien qu'un peu lentement, au bain-marie dans 30 cc. d'eau bouillante; lentement refroidie, cette solution donna 0^{gr},34 d'acide anhydre, répondant à env. 0^{gr},38 d'acide hydraté.

La quantité totale d'acide obtenu ne changea pas de poids, c'est-à-dire, ne donna pas des variations d' $\frac{1}{2}$ mgr. pour les différentes pesées, quand on l'exposa pendant 16 heures dans le vide à 70—75° ou à l'humidité durant 16 heures.

0^{gr},1347 répondaient à 11^{cc},60 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,61 % d'azote, calculé à 8,70 %).

Expérience N° 3. 1 gr. d'acide anhydre fut dissous au bain-marie dans 40 cc. d'eau bouillante, et la solution fut refroidie rapidement à l'eau froide (env. 10°); quand on l'agita avec une baguette de verre, l'acide ne tarda pas à se déposer, après quoi le tout fut laissé à la température ambiante jusqu'au lendemain, et alors on trouva que la totalité de l'acide déposé pesait 0^{gr},75.

0^{gr},4647 perdirent 0^{gr},0426 (9,17 %) dans le vide en 16 heures à la température de 70—75°, et reprirent 0^{gr},0423 à l'humidité.

0^{gr},2171 répondaient à 17^{cc},10 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (7,88 % d'azote, ce qui correspond à 8,68 % d'azote dans l'acide anhydre).

On a donc ici un mélange d'acide hydraté et d'acide anhydre.

Expérience N° 4. 1 gr. d'acide hydraté dissous dans 20 cc. d'eau et 1^{cc},5 d'acide chlorhydrique 5-norm. fut reprécipité quand on ajouta 1^{cc},5 d'eau ammoniacale 5-norm. (la température était de 24 à 25°). Après un jour de repos, on filtra, et débarrassa l'acide de son chlore en lavant avec de l'eau froide et saturée d'acide anhydre. On en tira 0^{gr},88 d'acide anhydre, répondant à env. 0^{gr},98 d'acide hydraté.

Séché à l'air, l'acide isolé ne changeait pas de poids dans le vide à 70—75°, ni à l'air.

0^{gr},2062 répondaient à 17^{cc},90 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,68 % d'azote).

Au titrage par de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.) et de la phénolphthaléine, 0^{gr},2810 exigèrent 17^{cc},74; calculé 17^{cc},52. (Le virage était difficile à observer.)

0^{gr},2309 donnèrent 0^{gr},1442 d'eau (6,95 % d'hydrogène) et 0^{gr},3792 d'acide carbonique (44,78 % de carbone); (calculé à 6,83 % d'hydrogène et 44,72 % de carbone).

Expérience N° 5. 1 gr. d'acide anhydre fut dissous en 20 cc. d'eau additionnée de 2 cc. d'eau ammoniacale 5 norm., et l'on refroidit la solution dans un mélange réfrigérant assez fort pour faire

apparaître dans le liquide quelques glaçons; puis on y ajouta, en remuant bien, 10 cc. d'acide chlorhydrique normal refroidi à la glace. Laisse dans une glacière jusqu'au lendemain, le liquide fut filtré, et le précipité lavé avec de l'eau froide et saturée d'acide hydraté. On en eut 1^{gr},05 d'acide hydraté, répondant à env. 0^{gr},94 d'acide anhydre.

0^{gr},6014 perdirent dans le vide à 70—75° en 16 heures 0^{gr},0618 d'eau (10,28 %), et les recouvrèrent entièrement à l'humidité.

0^{gr},2014 répondaient à 15 cc,55 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (7,72 % d'azote).

Acide α -aminoadipique anhydre.

		Calculé	Trouvé					
C ₆	72	44,72	44,78					
H ₁₁	11	6,83	6,95					
O ₄	64	39,75						
N	14	8,70	8,68	8,63	8,68	8,66	8,61	
161		100,00						

Acide α -aminoadipique avec 1 mol. d'eau.

		Calculé	Trouvé		
C ₆	72	40,22	40,26		
H ₁₃	13	7,26	7,44		
O ₅	80	44,70			
N	14	7,82	7,74	7,72	
179		100,00			
H ₂ O	18	10,06	10,40	10,28	

L'acide anhydre cristallisa en lamelles; le microscope y révéla principalement des fragments foliiformes souvent formant des agglomérats de feuilles longues et minces, ou bien, mais assez rarement, des feuilles bien développées, à quatre ou six côtés.

L'acide hydraté se présentait sous forme de précipité à grains fins, où le microscope faisait voir des aiguilles assez épaisses, souvent soudées entre elles, parfois des cristaux prismatiques bien formés, à quatre ou six pans.

Chauffé rapidement dans un tube capillaire, l'acide anhydre fondait entre 204 et 206° (corr.), l'hydraté à quelques degrés de moins. La fusion était accompagnée d'une effervescence faible mais manifeste quand il s'agissait de l'acide anhydre, et d'une forte écume lorsque l'acide était hydraté.

L'un et l'autre acide étaient très peu solubles dans l'alcool, tant chaud que froid, et dans l'éther. L'eau froide dissolvait presque deux fois plus de l'acide hydraté que de l'anhydre; car 1 gr. d'acide hydraté était dissous à 19—20° par env. 240 gr. d'eau, tandis que pour se dissoudre à la même température, l'acide anhydre exigeait près de 450 gr. d'eau.

1/2 gr. d'acide hydraté fut traité pendant 2 heures par 50 cc. d'eau dans un agitateur et à la température ordinaire; puis on tira par filtration l'échantillon *a*, et de même, après encore 2 heures d'agitation, l'échantillon *b*.

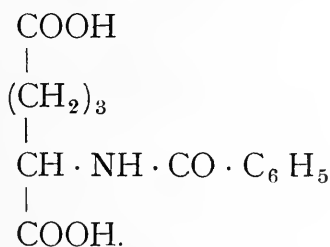
L'échantillon *a* pesait 16^{gr},162 (température 19°), et contenait 5^{mgr},22 d'azote, répondant à 66^{mgr},75 d'acide hydraté avec 1 molécule d'eau, c'est-à-dire que 1 gr. d'acide hydraté se dissolvait en 241^{gr},1 d'eau.

L'échantillon *b* pesait 22^{gr},705 (température 20°), et renfermait 7^{mgr},34 d'azote, répondant à 93^{mgr},86 d'acide hydraté, soit: 1 gr. d'acide hydraté exigeait 240^{gr},9 d'eau.

1/2 gr. d'acide anhydre fut traité par 50 cc. d'eau à la température ambiante et en agitant pendant 2 heures, après quoi on leva par filtration l'échantillon *c*.

L'échantillon *c* pesait 16^{gr},834 (température 19°) et contenait 3^{mgr},22 d'azote, répondant à 37^{mgr},01 d'acide anhydre, soit 1 gr. d'acide anhydre dissous en 453^{gr},8 d'eau.

3. Acide benzoyl- α -aminoadipique :



J'ai obtenu ce composé une fois seulement et par occasion.

A une solution alcoolique contenant 1/50 mol. gr. (7^{gr},4) d'éther butyronitril-phtalimidomalonique incomplètement hydrogéné par le sodium (voir la dernière section de ce mémoire, p. 60), on ajouta de l'eau, et en chassa l'alcool. On additionna de l'acide chlorhydrique concentré, ce qui transforma l'éther en un mélange de chlorhydrates d'acide α -aminoadipique et d'acide α - ϵ -diaminocaproïque, qu'une addition d'acide chlorhydrique au titre 33 % permit de séparer des chlorure de sodium et acide phtalique formés simultanément. Le mélange des chlorhydrates fut benzoylé de la manière ordinaire par le chlorure de benzoyle dans

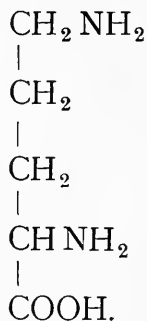
un liquide légèrement alcalin. D'une part on eut de la peine à tirer de ce mélange l'objet proprement dit de l'expérience, savoir l'acide α - ε -diaminocaproïque, à un degré de pureté suffisant pour l'analyse; mais d'autre part on réussit aisément à délivrer l'acide benzoyl- α -aminoadipique de l'acide α - ε -dibenzoyle-diaminocaproïque, desquels le premier est assez peu soluble dans l'eau et l'alcool à la température ordinaire, tandis que l'autre est assez soluble dans l'alcool¹⁾. Après recristallisation dans l'eau chaude, l'acide α -benzoyl-aminoadipique formait un beau précipité blanc et cristallin, où le microscope révéla surtout des prismes à quatre pans bien développés.

Le point de fusion était de 184^0 (corr.).

0^{gr},1445 donnèrent par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 7^{cc},65 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,29 % d'azote, calculé 5,28 %).

0^{gr},2026, titrés par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 15^{cc},28; calculé: 15^{cc},35.

IV. Acide α - δ -diaminovalérique:



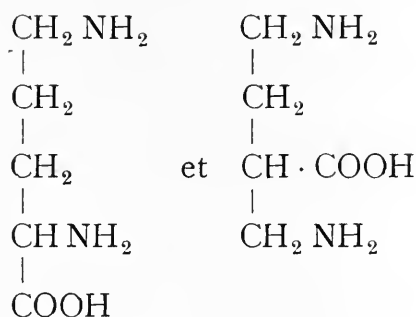
Il y a 25 ans, M. Jaffé²⁾ recueillit des excréments de poules nourries à l'acide benzoïque, et il en retira un acide: $\text{C}_{19} \text{H}_{20} \text{O}_4 \text{N}_2$, qu'il dénomma acide ornithurique. Il prépara quelques sels de cet acide, entre autres l'ornithurate de calcium qui est caractéristique. En dédoublant l'acide ornithurique par l'acide chlorhydrique, il constata que le premier devait être considéré comme un acide diaminovalérique, dans lequel deux atomes d'hydrogène étaient remplacés par deux radicaux $\text{C}_6 \text{H}_5 \text{CO}$. L'intérêt des travaux importants de Jaffé s'accrût encore quand E. Schulze et E. Winterstein³⁾, faisant bouillir avec une solution d'hydroxyde de ba-

¹⁾ Conférer Clara Wildenow: Zeitschrift f. physiol. Chem. XXV, 525 (1898).

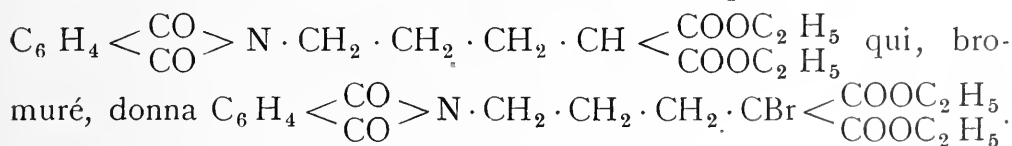
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. X, 1925 (1877) et XI, 406 (1878).

³⁾ Ibid. XXX, 2879 (1897), et Zeitschrift f. physiol. Chem. XXVI, 1 (1898).

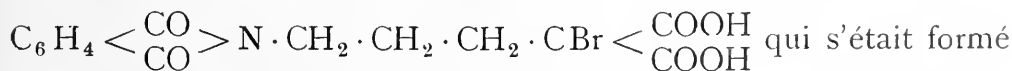
ryum réussirent à dédoubler l'arginine en urée et en un acide diaminovalérique qui, traité par le chlorure de benzoyle dans un liquide alcalin, donna l'acide ornithurique de Jaffé. Peu après, A. Ellinger¹⁾, se servant de bactéries de putréfaction, parvint à décomposer l'acide diaminovalérique de Jaffé en acide carbonique et en tétraméthylendiamine, définissant par là le rapport mutuel de position des deux radicaux NH_2 dans la molécule. Après cela il ne restait plus à choisir qu'entre ces deux formules-ci :



pour représenter le susdit acide diaminovalérique, et par la belle synthèse que E. Fischer²⁾ a faite récemment de l'acide α - δ -diaminovalérique racémique il est devenu très vraisemblable que la première de ces formules est la vraie. La substance que E. Fischer prit pour point de départ, fut l'éther γ -phtalimidopropyl-malonique tiré par S. Gabriel³⁾ des phtalimide potassique, bromure de triméthylène et éther d'acide malonique, savoir



Convenablement traitée par le bromure d'hydrogène, cette dernière combinaison put être saponifiée, et l'acide malonique substitué



à sa place, pouvait, à une température de 140 à 145°, dégager de l'acide carbonique avec formation d'acide δ -phtalimido- α -bromovalérianique: $\text{C}_6\text{H}_4 < \begin{array}{c} \text{CO} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CO} \end{array} > \text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHBr} \cdot \text{COOH}$.

Cette dernière substance, étant traitée par l'ammoniaque en tube scellé, et le produit de la réaction étant ensuite chauffé

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chem. XXIX, 334 (1900).

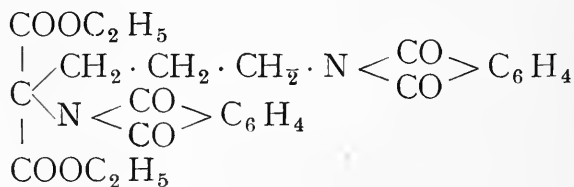
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 454 (1901).

³⁾ Ibid. XXIII, 1767 (1890), et XXIV, 1365 (1891).

avec de l'acide chlorhydrique dans des tubes scellés, se scinda en acide phtalique et en un acide α - δ -diaminovalérique qu'on caractérisa en le transformant en son substitut dibenzoylé. L'acide ornithurique extrait des produits naturels était optiquement actif, et il va de soi que le produit artificiel en différât; mais, abstraction faite de cela, Fischer constata un si parfait accord entre les acides ornithuriques naturel et artificiel que, d'après lui, c'est à peine si l'on saurait douter que l'acide ornithurique naturel dérive de l'acide α - δ -diaminovalérique.

Le procédé décrit plus loin pour la préparation de »l'acide ornithurique artificiel«, ou acide α - δ -diaminovalérique racémique, est extraordinairement simple et donne un excellent résultat. La méthode est sommairement indiquée dans l'introduction de ce mémoire. Sur quelques points il me semble que l'acide ornithurique préparé par moi d'après ce procédé affecte de différer tant de celui que Fischer a produit par synthèse que de l'acide naturel, et la fin de ce mémoire présentera un tableau comparatif de ces divergences.

1. Éther phtalimido- γ -phtalimidopropyl-malonique :



Dans un ballon d' $1\frac{1}{2}$ litre, muni d'un tube rafraîchisseur à reflux et dont l'extrémité supérieure avait un tube en U contenant du chlorure de calcium, on fit réagir $\frac{1}{5}$ mol. gr. d'éther phtalimidosodomalonique (v. p. 10) sur 54 gr. ($\frac{1}{5}$ mol. gr. = 53^{gr},6) de γ -bromophtalimidopropyle¹⁾ pur et recristallisé dans l'éther de pétrole, en chauffant dans le bain d'huile vers 175°. Au bout d'une heure de chauffage, la réaction était déjà bien lancée; 2 heures encore, et la masse était tout à fait coulante, n'ayant que quelques grumeaux isolés, à réaction alcaline, et quand on eut chauffé pendant 4 heures en agitant à diverses reprises, la

¹⁾ Préparé par le procédé de S. Gabriel et J. Weiner (Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXI, 2671 [1888]).

réaction était terminée. On refroidit convenablement, et traita aussitôt par l'eau chaude au bain d'eau bouillante et en agitant bien, ce qui fit dissoudre le bromure de sodium; l'huile non dissoute se trouva alors assez coulante pour se laisser transvaser du ballon dans une capsule par des rinçages réitérés à l'eau chaude; mais il arriva aussi qu'on put constater le signe d'une excellente réaction, savoir que la masse commençait à se solidifier pendant qu'on la traitait par l'eau, et alors il fallait sacrifier le ballon. En tout cas cette matière se solidifia par le refroidissement, formant une masse dure, parfois assez plastique; on la lava ensuite à l'eau froide pour lui enlever son bromure de sodium. Le rendement en produit sec répondit au calcul; brute, la substance était d'un gris jaunâtre.

Pour la purifier, on la fit dissoudre dans 500 à 600 cc. d'alcool bouillant (environ deux fois la quantité nécessaire), et la solution chaude fut filtrée dans un entonnoir pour filtrer à chaud, où elle laissa un petit dépôt gélatineux de couleur jaunâtre. Au cours de la filtration, une partie du composé cristallisa ordinairement sur le filtre. C'est pourquoi on porta le filtre à l'ébullition avec 100 cc. d'alcool, qu'après filtration on ajouta à la dose principale. Refroidie rapidement et traitée enfin par l'eau de glace et simultanément bien remuée, cette solution fit tomber la combinaison sous forme d'un précipité très volumineux à cristaux fins, où le microscope révéla nombre de petites aiguilles, mais dont l'aspect était très irrégulier et fragmentaire¹⁾. Ce précipité fut séparé par filtration à l'aide d'un aspirateur, et subit un triple lavage soigneux avec l'alcool refroidi à la glace. Le rendement fut de 68 à 72 gr., mais l'eau-mère et l'alcool de lavage fournirent ultérieurement 5—6 gr., en sorte que le rendement total fut env. 75 % du produit calculé. Ici encore (comp. pp. 15 et 23) j'obtins relativement un peu moins en opérant sur des quantités moindres que celles qu'on vient d'indiquer.

Recristallisé, le produit avait un reflet jaunâtre ou grisâtre, qu'on ne pouvait pas faire disparaître par une nouvelle cristallisation dans l'alcool; on n'y découvrait pas trace d'impuretés.

¹⁾ Quand on faisait cristalliser lentement la substance dans une solution alcoolique, ou qu'on la faisait recristalliser dans l'éther (où la combinaison se dissolvait cependant assez difficilement), elle était susceptible de se déposer sous forme d'un beau précipité à gros cristaux qui, examinés au microscope, affectaient la forme de prismes quadrilatères et hécotoédriques.

Séchés à l'air, ces préparations donnèrent à l'analyse le résultat suivant:

0^{gr},2722 de la préparation A donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},48 d'une solution d'hypo-sulfite norm. au 1/14 (5,69 % d'azote).

0^{gr},3167 de la préparation B répondaient à 18^{cc},16 de cette solution (5,73 % d'azote).

0^{gr},2835 de la préparation C répondaient à 16^{cc},23 de la même solution d'hyposulfite (5,72 % d'azote).

0^{gr},4082 de la préparation D répondaient à 23^{cc},24 de la même solution (5,69 % d'azote).

0^{gr},1856 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0845 d'eau (5,06 % d'hydrogène) et 0^{gr},4316 d'acide carbonique (63,42 % de carbone).

		Calculé	Trouvé			
C ₂₆	312	63,41	63,42			
H ₂₄	24	4,88	5,06			
O ₈	128	26,02				
N ₂	28	5,69	5,69	5,73	5,72	5,69
		492	100,00			

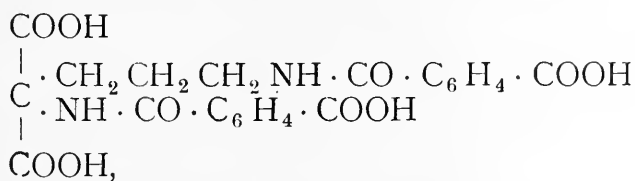
L'éther γ -phtalimidopropyl-malonique fondit vers 125° dans l'appareil de Roth, mais se contracta à quelques degrés avant le point de fusion.

La combinaison était très soluble dans le benzol, le chloroforme, l'acétone, l'éther acétique et l'alcool chaud, peu soluble dans l'alcool froid et dans l'éther; il était très peu soluble dans l'éther de pétrole et insoluble dans l'eau.

La combinaison en question contient souvent du triméthylènediphtalimide provenant, ou de ce que le γ -bromopropylphtalimide employé l'aurait contenu, ou de ce que le phtalimidomalonate d'éthyle aurait renfermé du phtalimide engendrant dans le phtalimidosodomalonate d'éthyle du phtalimide sodique qui, avec le γ -bromopropylphtalimide produirait cette impureté. Celle-ci se révèle soit par la richesse de la substance en azote, soit par son hésitation à fondre complètement même à beaucoup au-dessus de 125°. Aucun procédé ne m'a réussi pour enlever cette impureté par recristallisation; si donc on veut un produit pur, il faut partir de matières pures. Du reste, ladite impureté n'a pas d'importance quand on veut préparer l'acide ornithurique par le procédé décrit plus loin (voir p. 44). Dans ce cas le triméthylènediphtalimide se transforme en un substitut dibenzoylique de

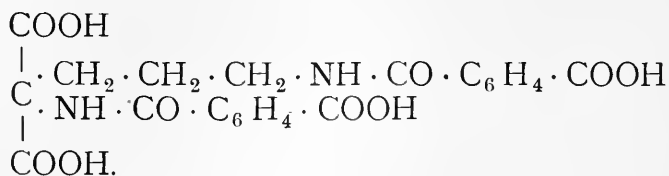
triméthylènediamine insoluble dans une faible lessive de soude et contrastant ainsi avec l'acide ornithurique.

L'éther phtalimido- γ -phtalimidopropylmalonique se laisse bien décomposer à chaud par l'acide chlorhydrique concentré ou par le bromure d'hydrogène concentré; mais même en employant ce dernier acide à des températures assez élevées, la réaction s'effectue très lentement. Sans dépasser les basses températures et avec beaucoup plus de facilité, on obtient cette décomposition par le procédé déjà mentionné (p. 5). Pour cela, on commence par dissoudre la combinaison dans une lessive de soude; il se forme alors un sel sodique de l'acide tétrabasique:



qu'on dédouble ensuite à chaud par l'acide chlorhydrique. Ces deux transformations s'effectuent avec une extrême facilité et sans que la température doive dépasser celle du bain-marie; il n'est pas besoin de précipiter, encore moins de produire à l'état de pureté le sus-mentionné acide tétrabasique; la solution du sel de soude, convenablement étendue, peut être sursaturée d'acide chlorhydrique, puis décomposée au bain-marie.

Toutefois, l'acide tétrabasique en question affecte deux formes, savoir celle d'une modification aqueuse bien soluble dans l'eau, surtout à chaud, et celle d'une modification anhydre se dissolvant très mal dans l'eau, même bouillante, et qu'on a beaucoup de peine à dédoubler par l'acide chlorhydrique bouillant. Pour empêcher l'apparition de cette dernière forme, on doit, en préparant l'acide ornithurique, suivre assez exactement la méthode décrite plus loin (voir p. 44), qui tient compte des propriétés différentes qu'ont ces deux modifications. Comme on l'a déjà dit, l'acide tétrabasique n'a pas besoin d'être pur pour servir à la préparation de l'acide ornithurique; mais il a été nécessaire de préparer ses deux modifications à l'état le plus pur possible, afin d'en étudier les propriétés respectives. Les expériences qui s'y rapportent se trouvent décrites avant qu'il soit parlé de la préparation de l'acide ornithurique.

2. Acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique :

a. Modification hydratée (à environ 4 mol. d'eau). Dans un matras d'un litre contenant $\frac{1}{20}$ mol. gr. (24^{gr},6) d'éther phtalimido- γ -phtalimidopropylmalonique on versa une solution de $\frac{1}{2}$ mol gr. (20 gr.) d'hydroxyde de sodium en 40 cc. d'eau. En agitant bien, on eut une bouillie épaisse, qu'on chauffa légèrement pendant quelques minutes; elle dégagea manifestement de l'alcool et se résolut complètement en un liquide jaunâtre oléagineux. Pendant une demi-heure on chauffa au bain-marie bouillant, ce qui donna un léger précipité blanc, sans doute un sel sodique de l'acide en question; refroidie et mise enfin dans la glace, la masse devint presque sirupeuse. On mit de la glace dans cette masse même, qui en devint plus coulante; on y fit tomber goutte à goutte, et en agitant bien, de l'acide chlorhydrique 5-norm. et refroidi à la glace, jusqu'à ce que le liquide montrât une petite réaction acide et que le précipité formé ne se redissolût plus. Puis on filtra, et en remuant bien, on versa petit à petit dans le liquide filtré et refroidi à la glace 100 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm. et frappé, qui fit tomber l'acide tétrabasique partiellement en cristaux et en partie comme masse oléagineuse. Abandonnée dans l'eau de glace, souvent remuée et délivrée par trituration des plus forts grumeaux huileux, la totalité de l'acide ne tarda pas à se figer en une masse cristalline. A faible grossissement, on trouva des masses cristallines confuses, qu'un microscope plus fort résolvait en simples aiguilles toutes petites. On les pila bien dans un mortier et filtra, puis lava le précipité avec de l'eau frappée jusqu'à ce qu'on en eût enlevé le chlore.

Séché à l'air, l'acide hydraté rendit 18^{gr},6 (68,4 % du calculé: 27^{gr},2); mais, évaporés au bain-marie avec de l'acide chlorhydrique, puis traités comme on l'indiquera (p. 44) pour la préparation de l'acide ornithurique, les liquides filtré et de lavage donnèrent 4^{gr},1 de cet acide, soit 24,1 % de $\frac{1}{20}$ mol. gr. (17 gr.) d'acide ornithurique; les quantités totales trouvée et calculée avaient donc le rapport 92,5 à 100.

1^{gr},2799 de l'acide séché à l'air perdirent par leur séjour dans le vide et sur l'acide sulfurique 11,06 % durant le premier jour; cette dessiccation prolongée, la perte journalière diminua de jour en jour; le cinquième jour la perte était inférieure à 1 milligramme, soit en tout 13,42 % (au lieu de 13,24 % pour 4 mol. d'eau); exposant ensuite à l'humidité, on constata qu'au bout de deux jours presque toute l'eau était rentrée (12,92 %).

0^{gr},2992 donnèrent, au dosage de l'azote, une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},55 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,20 % d'azote, calculé pour 13,42 % d'eau dans l'acide: 5,13 % d'azote).

0^{gr},3447, titrés par de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 25^{cc},20; calculé pour 13,42 % d'eau dans l'acide: 25^{cc},39).

L'acide hydraté peut aussi se tirer de l'anhydre, dont on mentionnera plus tard la préparation: pour cela, on dissout ce dernier dans une solution d'hydroxyde de sodium et précipite à froid la solution par l'acide chlorhydrique.

$\frac{1}{200}$ gr.-mol. (2^{gr},36) d'acide anhydre fut dissous en 10 cc. d'une solution double normale d'hydroxyde de sodium (quantité calculée) + 30 cc. d'eau. Cette solution, refroidie à l'eau de glace, fut additionnée de 5 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm., mais il n'en résulta aucun précipité même après $\frac{1}{2}$ heure passée dans le bain de glace, et bien qu'on remuât fréquemment. On ajouta alors 5 cc. d'acide chlorhydrique concentré, après quoi l'on agita le liquide, et il commença à s'y former un volumineux précipité blanc, que le microscope résolut en petites aiguilles entremêlées pourtant de quelques cristaux lamellés. Après trois heures d'exposition à la température de la glace fondante, on filtra, et le précipité fut purgé de chlore par lavage à l'eau frappée. Le rendement fut de 2^{gr},3 (le calcul disait 2^{gr},72).

0^{gr},7916 d'acide séché à l'air subirent en trois jours, dans le vide sur l'acide sulfurique, une perte totale de 0^{gr},1104 (13,95 %); durant la dernière journée le poids ne diminua que de 1 mgr. Exposé ensuite à l'humidité, il y eut récupération de 13,59 % d'eau.

0^{gr},2042 donnèrent, au dosage de l'azote, une quantité d'ammoniaque répondant à 10^{cc},43 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,11 % d'azote).

0^{gr},2352 donnèrent 0^{gr},1141 d'eau (5,39 % d'hydrogène) et 0^{gr},4136 d'acide carbonique (47,96 % de carbone).

0^{gr},3103, titrés par de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 22^{cc},70 (calculé pour un acide ayant 13,95 % d'eau: 22^{cc},72).

Calculé pour un acide tétrabasi-
que, hydraté à 13,95 % d'eau

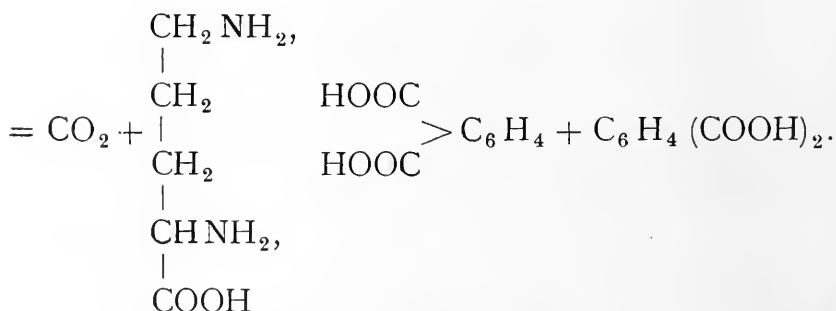
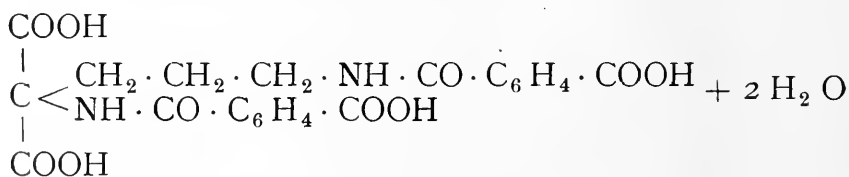
Trouvé

C	48,18	47,96
H	5,19	5,39
O	41,52	
N	5,11	5,11

100,00

Chauffé rapidement dans des tubes capillaires, l'acide hydraté fondait avec effervescence quand on dépassait un peu 100° (101—106°); mais dès qu'on approchait de 90°, il commençait à se contracter. Déshydraté sur l'acide sulfurique, l'acide en question se contractait dès 115—120° et fondait en moussant avec force vers les 125°; exposé sur l'eau, l'acide déshydraté, en reprenant son eau de cristallisation, retrouvait le même point de fusion qu'avant d'avoir perdu son eau.

Dans l'eau froide l'acide hydraté était assez difficilement soluble; il se dissolvait aisément dans l'eau chaude et ne dégageait alors presque pas d'acide carbonique; mais en refroidissant il recristallisait mal. En prolongeant le chauffage de la solution au bain-marie, on scindait l'acide: il y eut non seulement un dégagement d'acide carbonique, mais en même temps une formation d'acide phtalique, dont une partie, la solution étant suffisamment concentrée, cristallisait par refroidissement, tandis qu'une autre partie, présente dans la solution comme phtalate d'«ornithine» (acide α - δ -diaminovalérique), ne se précipitait que par l'addition d'acide chlorhydrique:



Cependant, il n'y avait pas de décomposition complète de l'acide tétrabasique hydraté quand on le chauffait à l'eau seule; pour y arriver, il fallait chauffer en présence de l'acide chlorhydrique, et alors on eut naturellement la totalité de l'acide phtalique à l'état libre.

L'alcool dissolvait très aisément l'acide hydraté, même à la température ordinaire; l'éther donnait un précipité dans la solution. D'une part, l'eau ne donnait pas de précipité si les solutions alcooliques étaient faibles, et d'autre part, il suffisait d'ajouter à une forte solution alcoolique de l'acide 1 ou 2 volumes d'eau et de remuer le liquide pour y avoir bientôt un volumineux précipité, où le microscope révélait des groupes de belles aiguilles. Dans l'éther l'acide hydraté était très peu soluble.

b. Pour produire la modification anhydre de l'acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique il ne suffisait pas de le déshydrater dans le vide sur l'acide sulfurique; car l'acide anhydre obtenu faisait contraste avec la modification anhydre telle qu'on va la décrire et pouvait soit reprendre l'eau de cristallisation par l'exposition à l'humidité, soit se dissoudre aisément dans l'eau chaude comme dans l'alcool froid, et enfin son point de fusion était env. 125° , c'est-à-dire de beaucoup inférieur à celui de la modification anhydre ($192-193^{\circ}$). La déshydratation de l'acide hydraté dans le vide à une température dépassant l'ambiante, enleva non seulement l'eau, mais encore l'acide carbonique.

Je n'ai pu trouver aucun procédé qui fasse obtenir un rendement passable de la modification anhydre; mais il est aisé de s'en procurer des quantités assez notables en sursaturant d'acide chlorhydrique concentré les solutions aqueuses du sel sodique sans les refroidir (comp. la préparation de la modification hydratée). En préparant l'acide ornithurique avant de connaître cet état de choses, il m'est parfois arrivé de dissoudre, comme on l'a décrit plus haut (v. p. 38), l'éther phtalimido- γ -propylphtalimido-malonique dans une forte lessive de soude, et comme je ne me proposais pas de préparer l'acide tétrabasique comme produit intermédiaire, la solution ne fut refroidie que jusqu'à la température ambiante, étendue d'un peu d'eau, puis sursaturée d'acide chlorhydrique concentré sans refroidissement ultérieur. Il en résulta une forte production de chaleur et un abondant dégagement d'acide carbonique, pendant lesquels se forma un

précipité huileux, que l'application de la chaleur au bain-marie fit en partie dissoudre et en partie cristalliser. Examiné de près, le précipité obtenu se trouva être non plus de l'acide phtalique pur, comme je l'avais d'abord admis, mais au contraire un mélange d'acide phtalique et de l'acide anhydre dont il est ici parlé. La teneur en azote était dans l'une des expériences 11 %, et dans l'autre 16 % de la totalité d'azote contenue dans la matière employée comme point de départ. Dans le premier cas le mélange d'acide phtalique et d'acide tétrabasique fut de nouveau dissous dans une lessive de soude, et le liquide résultant, suffisamment dilué et refroidi et additionné d'acide chlorhydrique, donna un précipité de l'acide *hydraté*, qui fut transformé en acide ornithurique, de la manière qu'on décrira plus tard. Dans l'autre cas, où l'expérience consomma $\frac{1}{10}$ mol. gr. (49^{gr,2}) d'éther phtalimido- γ -propylphtalimido-malonique, on chercha d'abord à décomposer l'acide tétrabasique mêlé d'acide phtalique, en le chauffant pendant 3 heures au bain-marie avec 200 cc. d'eau et 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré; mais on n'y réussit guère, car l'acide phtalique obtenu par refroidissement, filtration et lavage à l'eau froide contenait encore un total de 313 mgr. d'azote, soit environ 11 % de la quantité d'azote de la matière servant de point de départ (2800 mgr. d'azote). L'acide obtenu en dernier lieu fut alors traité à plusieurs reprises par de l'eau bouillante, et des extraits aqueux qui en résultèrent on tira par refroidissement et cristallisation un acide phtalique presque absolument pur; il resta un résidu non dissous et constituant une poudre blanche presque insoluble dans l'eau chaude et qui, séchée à l'air, pesait 4 gr. (11 % de $\frac{1}{10}$ mol. d'acide tétrabasique anhydre pèsent 5^{gr,2}).

0^{gr,2191} d'acide séché à l'air donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 12^{cc,98} d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,92 % d'azote, calculé à 5,93 % pour l'acide tétrabasique anhydre).

0^{gr,2588} exigèrent pour la neutralisation à la phénolphtaléine comme indicateur 21^{cc,7} d'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), (calcul: 22^{cc,0}).

Rapidement chauffé en tube capillaire, l'acide anhydre fondit entre 192 et 193° (corr.), mais vers 190° il commença à se contracter.

Dans l'eau froide l'acide anhydre était pour ainsi dire insoluble; il se dissolvait très difficilement dans l'eau chaude, et

dans l'éther il était très peu soluble, de même que la modification hydratée.

Dans l'alcool froid l'acide était difficilement soluble; au contraire, il se dissolvait assez aisément dans l'alcool chaud, et quand on ajoutait de l'eau à la solution alcoolique, on pouvait de nouveau en précipiter l'acide en presque totalité. $\frac{1}{2}$ gr. d'acide anhydre fut dissous en 15 cc. d'alcool chaud; dès qu'on refroidit, on vit se détacher de petits cristaux brillants, dont le nombre augmenta au fur et à mesure qu'on ajoutait de l'eau; on en mit peu à peu 60 cc. Le précipité, vu au microscope, présentait exclusivement de petits cristaux courts et prismatiques; on filtra et fit deux lavages à l'eau, après quoi le produit séché à l'air pesait 0^{gr},45. L'acide ainsi obtenu fondait dès 150° et, séché dans le vide sur l'acide sulfurique, perdait 2 % de son poids; on fit alors bouillir la totalité de l'acide dans 3×10 cc. d'eau, puis on filtra et lava de nouveau à l'eau froide; cette manipulation laissa 0^{gr},39 d'acide séché à l'air. La solubilité presque nulle dans l'eau chaude montrait donc clairement qu'il s'agissait ici de la modification anhydre de l'acide; mais même après qu'on eut traité par l'eau bouillante, le point de fusion dépassait encore à peine 150° et, déshydraté par l'acide sulfurique dans le vide, l'acide abandonna environ 2 % d'eau.

0^{gr},0821 d'acide séché dans le vide par l'acide sulfurique, donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 4^{cc},88 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,94 % d'azote, calcul: 5,93 %).

0^{gr},2519 du même acide que ci-dessus, titré par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 21^{cc},3 (calcul: 21^{gr},4).

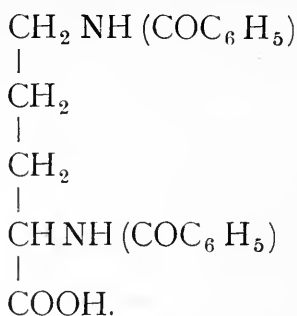
La modification anhydre se laisse transformer en l'hydratée, comme on l'a déjà mentionné (p. 39), et il résulte de ce qui précède qu'on peut préparer la modification anhydre en dissolvant l'acide hydraté dans une lessive de soude et précipitant ensuite, dans des conditions convenables, par l'acide chlorhydrique. J'ai également réussi à produire de très petites quantités de la modification anhydre simplement en traitant l'hydratée par l'acide chlorhydrique et chauffant un peu. A titre d'exemple, voici une expérience isolée:

2 gr. d'acide hydraté furent dissous en 30 cc. d'eau chaude, puis on y ajouta 30 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et le tout fut chauffé à 50—60° en remuant fréquemment. Il ne tarda pas à se former un précipité cristallin, dont le microscope

révéla l'aspect très irrégulier, mais où il fit voir entre autres une quantité de cristaux aciculés, certainement composés de la modification hydratée de l'acide. On filtra le précipité, le lava à l'eau froide pour enlever l'acide chlorhydrique, puis on le fit *bouillir* à plusieurs eaux; il en resta à l'état non dissous environ 0^{gr},1 d'un acide très peu soluble dans l'eau chaude et qui, séché à l'air, fondait bien dès qu'il approchait de 180°, mais pourtant affectait la teneur en azote calculée pour l'acide anhydre.

0^{gr},0539 donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 3^{cc},18 d'hyposulfite norm. au ¹/₁₄ (5,90 % d'azote; calcul: 5,93 %).

3. Acide α δ -dibenzoyle-diaminovalérique (ou acide ornithurique artificiel):



¹/₁₀ mol. gr. (49^{gr},2) d'éther phtalimido- γ -propylphtalimido-malonique traité dans un matras de 2 litres par une solution de 40 gr. d'hydroxyde de sodium en 80 cc. d'eau, se transforma en sel sodique d'acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique (v. p. 38). On refroidit le liquide et l'étendit d'eau et de glace jusqu'à volume d'environ un litre, après quoi l'on y ajouta, peu à peu et en remuant bien, 250 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm. (il fallait 200 cc. pour neutraliser la quantité employée d'hydroxyde de sodium); il n'en résulta aucun ou seulement un petit précipité, qui fut aisément dissous par la chaleur du bain-marie. En chauffant ainsi, l'on ne tarda pas à constater un abondant dégagement d'acide carbonique, qui cessa au bout d'une ou deux heures; alors on y ajouta encore 300 cc. d'acide chlorhydrique concentré, après quoi le liquide fut transvasé dans une capsule en porcelaine et évaporé au bain-marie jusqu'à abondant dépôt de sel marin et réduction de l'eau-mère à env. 100 cc. Après refroidissement, on ajouta 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et la masse fut bien écrasée au pilon dans la capsule. L'ayant laissée une heure dans l'eau frappée, on en sépara par filtration le mé-

lange obtenu de chlorure de sodium et d'acide phtalique, qu'on lava bien à plusieurs reprises avec un mélange, refroidi à la glace, de 4 volumes d'acide chlorhydrique concentré et d'un volume d'eau¹⁾. La solution chlorhydrique obtenue fut évaporée au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse, puis reprise à l'eau frappée à dose minima, et l'acide phtalique qui resta en fut séparé sur un petit filtre, puis subit un lavage réitéré à l'eau froide²⁾.

La solution aqueuse ainsi obtenue du chlorhydrate de l'acide α - δ -diaminovalérique fut additionnée d'une lessive de soude 2-norm. jusqu'à réaction franchement alcaline, puis étendue d'eau au point de donner en tout près d' $1\frac{1}{2}$ l. Refroidie à l'eau frappée, elle fut benzoylée par addition de dix doses égales de chlorure de benzoyle, en tout 47 cc. = 56 gr. (c'est-à-dire le double de la dose calculée), plus 425 cc. de lessive de soude 2-norm. (dose calculée: 400 cc.). A chaque addition, la fiole où l'on benzoylait, fut bouchée au liège et installée dans un seau rempli de glace et qu'on secoua dans un agitateur jusqu'à disparition de l'odeur de chlorure de benzoyle, ordinairement 15 à 20 minutes. Les additions de lessive de soude furent dosées de telle sorte que chacune d'elles, même la dernière, laissât un petit excès de cette lessive. Une fois benzoylée, la masse laissa sur le filtre un très faible précipité (probablement une trace de dibenzoyltriméthylène-diamine due à ce que la matière d'origine contenait une trace de triméthylènediphtalimide). Le liquide filtré fut refroidi à la glace, et l'on y ajouta peu à peu 250 cc. d'acide chlorhydrique 2-norm., qui fit tomber un mélange d'acide benzoïque et d'acide ornithurique, lequel d'ordinaire cristallisait aussitôt. Resté tel jusqu'au lendemain, mais fréquemment remué, le liquide fut filtré à l'aspirateur, et le précipité débarrassé de chlore à l'eau froide. Puis on épuisa à l'eau bouillante le mélange des acides benzoïque et ornithurique jusqu'à n'avoir plus de cristallisation d'acide benzoïque dans les extraits aqueux refroidis. Enfin l'acide ornithurique restant fut bien malaxé à l'eau dans un mortier, puis soigneusement lavé à l'eau chaude dans un entonnoir *ad hoc*. Ce lavage ne fit perdre que très peu d'acide ornithurique; l'acide

¹⁾ Le mélange de chlorure de sodium et d'acide phtalique fut épuisé par l'eau froide, et l'acide phtalique qui resta, purgé de chlore et séché à l'air, pesait 27—30 gr. (calcul: 33 gr., 2) et ne contenait par gramme que 0 mgr., 2 d'azote.

²⁾ L'acide phtalique qui restait et qui était presque complètement exempt d'azote, pesait, après avoir été séché à l'air, 3 à 4 gr.

ornithurique brut séché à l'air rendit 28—30 gr., soit env. 85 % de la quantité calculée.

Cet acide ornithurique brut était presque parfaitement pur; il était d'un blanc pur; pour tous les échantillons que j'ai préparés, son point de fusion, au chauffage rapide en tube capillaire, était de 187—188° (corr.). (Pour l'acide ornithurique naturel Jaffé¹⁾ place le point de fusion à 182° [déc.], Schulze et Winterstein²⁾ à 184°, et pour l'acide ornithurique artificiel, Fischer³⁾ indique 184—185° [corr. 187—188°]. Aussi, la composition répondait-elle à la formule. Sur un seul point l'on constata une différence entre les préparations brutes d'acide ornithurique et les produits recristallisés dans l'alcool, le séchage dans le vide à 120° laissant à ces derniers leur couleur parfaitement blanche, tandis que cette dessiccation donnait aux préparations brutes une teinte jaunâtre tellement faible qu'on ne pouvait en juger qu'en la confrontant avec la blancheur des préparations pures. Séché à l'air, l'acide ornithurique brut subissait par dessiccation dans le vide à env. 120° une perte de poids d'environ 0,1 % seulement. Voici le résultat des analyses des préparations ainsi séchées:

0^{gr},2143 de la préparation A donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 17^{cc},54 d'hyposulfite norm. au 1/14 (8,18 % d'azote).

0^{gr},2031 de la préparation B répondaient à 16^{cc},65 de cette solution (8,20 % d'azote).

0^{gr},3161 de la préparation C répondaient à 25^{cc},92 de cette solution (8,20 % d'azote).

0^{gr},2885 de la préparation D répondaient à 23^{cc},62 de cette solution (8,19 % d'azote).

0^{gr},2085 de la préparation E répondaient à 16^{cc},97 de cette solution (8,14 % d'azote).

0^{gr},2490 de la préparation B donnèrent 0^{gr},1339 d'eau (5,98 % d'hydrogène) et 0^{gr},6097 d'acide carbonique (66,79 % de carbone).

		Calculé	Trouvé							
			Acide ornithur. brut				Acide ornithur. recrist. (v. plus bas)			
C ₁₉	228	67,06	66,79				67,04			
H ₂₀	20	5,88	5,98				6,09			
O ₄	64	18,82								
N ₂	28	8,24	8,18	8,20	8,20	8,19	8,14	8,20	8,17	
340		100,00								

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. X, 1927 (1877).

²⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie XXVI, 4 (1898).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 463 (1901).

On purifia parfaitement l'acide ornithurique en le faisant recristalliser dans l'alcool, opération qui a un point assez intéressant pour amener à décrire en détail quelques expériences.

20 gr. de l'acide ornithurique B furent dissous en 300 cc. d'alcool bouillant. Placée dans l'eau froide et fréquemment remuée, la solution déposa en un jour un volumineux précipité, de belle apparence, blanc et cristallin, où le microscope faisait voir des faisceaux de cristaux aciculés. On filtra, et le précipité fut lavé trois fois à l'aspirateur avec de l'alcool absolu. L'acide ornithurique B_I, séché à l'air¹⁾, donna 13^{gr},5 qui, séchés dans le vide à 120°, gardèrent leur couleur blanche et perdirent env. 1 % en poids, le point de fusion restant entre 187 et 188° (corr.) comme avant la recristallisation. Voici le résultat de l'analyse de la préparation séchée dans le vide:

0^{gr},1904 donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},62 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,20 % d'azote).

0^{gr},2233 donnèrent 0^{gr},1224 d'eau (6,09 % d'hydrogène) et 0^{gr},5489 d'acide carbonique (67,04 % de carbone).

0^{gr},5488 titrés par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 16^{cc},20 (calcul: 16^{cc},21).

L'eau-mère et l'alcool de lavage de B_I furent évaporés jusqu'à volume d'env. 100 cc., puis laissés dans l'eau froide pendant la nuit. L'acide ornithurique B_{II} recristallisé fut traité comme B_I et, séché à l'air, donna un poids de 4^{gr},7. Elle aussi, cette portion resta blanche quand on la sécha dans le vide à 120°, mais y perdit 1,3 % de son poids. L'acide sec fondait à 187° (corr.) et contenait 8,17 % d'azote.

0^{gr},2021 répondaient à 16,52 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,17 % d'azote).

L'acide ornithurique contenu dans les eau-mère et alcool de lavage de B_{II} fut isolé en distillant l'alcool à la vapeur d'eau. Complètement refroidi, le liquide fut filtré et l'acide ornithurique lavé trois fois à l'eau bouillante, après écrasement dans un mortier. Séché à l'air, B_{III} pesait 1^{gr},4 et prit nettement une teinte jaunâtre quand on le sécha dans le vide à 120°, perdant alors env. 0,8 % de son poids. L'acide sec fondait entre 184 et 185° (corr.) et contenait 8,15 % d'azote.

¹⁾ D'une part, l'acide ornithurique brut séché à l'air ne perdait presque rien de son poids quand on le séchait dans le vide à 120°, et, de leur côté, les produits recristallisés dans l'alcool, puis séchés à l'air, perdaient $\frac{1}{2}$ —1 $\frac{1}{2}$ % de leur poids lorsqu'on les séchait ensuite dans le vide à 120°.

L'expérience qu'on vient de décrire montre clairement que la recristallisation dans l'alcool rend possible d'amasser dans la dernière eau-mère alcoolique les faibles quantités d'impuretés du produit brut. Cependant cela n'exclut pas le cas où, traitant l'acide ornithurique par l'alcool chaud, on peut produire une petite quantité d'ornithurate d'éthyle, qui s'amassera probablement dans la dernière eau-mère alcoolique. Sans justifier cette opinion, la petite expérience que voici la rend admissible.

6^{gr},8 d'acide ornithurique brut C furent portés à l'ébullition avec 125 cc. d'alcool absolu dans un matras muni d'un tube réfrigérateur ascendant (on avait soigneusement fait bouillir dans l'alcool les bouchons employés). Au bout d'un jour, on eut C_I (3^{gr},75) par simple cristallisation, et C_{II} (2^{gr},78) de l'eau-mère en éliminant l'alcool par la vapeur d'eau.

Dans le vide à 120° C_I perdit env. 0,5 % de son poids sans rien perdre de sa blancheur; point de fusion de l'acide sec: 187—188° (corr.); teneur en azote: 8,15 %.

C_{II} en pareil cas perdit env. 1,7 % en poids et se teignit légèrement en jaunâtre; l'acide sec fondait à 183—184° (corr.) et contenait 8,11 % d'azote.

En agitant avec de l'éther C_I, C_{II} et l'acide ornithurique brut, et enlevant ensuite par évaporation les extraits éthériques, on n'eut plus qu'un reste insignifiant des extraits fournis par l'acide ornithurique brut et par le produit C_I; ce reste cristallisa aisément, tandis que l'extrait éthérique de C_{II} abandonna une quantité d'huile peu considérable, il est vrai, mais qui pourtant se laissait bien peser; je ne réussis pas à le faire cristalliser. L'éther ne pouvant pas extraire cette huile du produit brut, il est naturel d'admettre qu'elle s'est formée pendant la recristallisation. Traités par l'éther, C_I et C_{II} furent de nouveau séchés dans le vide à 120°, après quoi C_I fondit entre 187 et 188° (corr.), et sa teneur en azote fut de 8,17 %, tandis que pour C_{II} le point de fusion fut entre 186 et 187°, la teneur en azote étant la même (8,17 %).

Le résultat collectif de ces expériences et de leurs analogues relativement à la recristallisation fut comme suit:

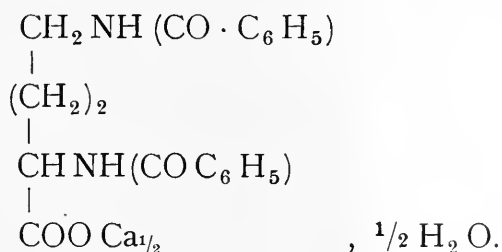
1° L'acide ornithurique brut, préparé comme on l'a décrit plus haut, doit être regardé comme à très peu près pur;

et 2° La recristallisation de l'acide ornithurique dans l'alcool peut fournir la majeure partie de l'acide à l'état de pureté par-

faite, et d'autre part le reste peut être retiré de l'eau-mère, mais alors il est mêlé d'une petite quantité d'une impureté huileuse.

Comme caractéristique parmi les produits dérivés de l'acide ornithurique naturel et de l'ornithine on peut mettre en relief spécial le sel calcaire d'acide ornithurique que Jaffé¹⁾ prépara le premier; de plus, la monobenzoylornithine préparée par lui²⁾ et la combinaison de l'isocyanate de phényle et de l'ornithine étudiée tout récemment par R. O. Herzog³⁾. Par comparaison, j'ai préparé les composés correspondants en partant de l'acide ornithurique artificiel.

4. Ornithurate de chaux :



Voici comment, en suivant les indications de Jaffé⁴⁾, je préparai ce sel de chaux qui caractérise l'acide ornithurique :

$\frac{1}{200}$ mol. gr. (1^{gr},7) d'acide ornithurique fut dissous en 20 cc. d'eau et quelques gouttes d'eau ammoniacale, et l'excès d'ammoniaque fut chassé au bain-marie bouillant; puis, ayant refroidi, on ajouta 4 cc. de chlorure de calcium 2-norm. (calculé à 2^{cc},5). Conformément aux indications de Jaffé, il n'en résulta aucun précipité tant que le liquide resta froid; mais le bain-marie bouillant ne tarda pas à donner lieu au dépôt d'un sel blanc à gros cristaux, que le microscope présenta comme composé de faisceaux et paquets de cristaux incolores purement lamellés (les autres auteurs qui ont décrit ce sel disent seulement qu'il est cristallin, mais ils ne parlent pas de l'aspect). Pendant $\frac{3}{4}$ d'heure on chauffa et remua le liquide, puis on le refroidit et le filtra, et le précipité fut débarrassé de son chlore par un lavage à l'eau froide. Le rendement fut de 1^{gr},3 (calcul: 1^{gr},8). Chauffant

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XI, 406 (1878).

²⁾ Ibid. XI, 408 (1878).

³⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie XXXIV, 525 (1902).

⁴⁾ A l'endroit cité.

ensuite l'eau-mère au bain-marie pendant deux heures, on n'eut qu'un dépôt de 0^{gr},05 d'un sel ayant tout à fait l'aspect du produit principal. L'analyse des produits séchés à l'air donna le résultat suivant:

0^{gr},4201 du sel A donnèrent 0^{gr},0325 de chaux calciné (5,52 % de calcium).

0^{gr},2732 du sel B donnèrent 0^{gr},0209 de chaux calciné (5,45 % de calcium).

0^{gr},2021 du sel A donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},30 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (7,57 % d'azote).

0^{gr},1937 du sel B répondaient 14^{cc},70 de cette solution (7,56 % d'azote).

0^{gr},2065 du sel B donnèrent 0^{gr},1039 d'eau (5,59 % d'hydrogène) et 0^{gr},4681 d'acide carbonique (61,84 % de carbone).

0^{gr},5858 du sel A, restés dans le vide sur l'acide sulfurique pendant 24 heures, avaient perdu 1 mgr.; mais ensuite, ni dans le vide sur l'acide sulfurique, ni dans le vide à 70°—75°, ils ne perdirent rien en 24 heures, tandis que dans le vide entre 110° et 115° ils perdirent encore 13^{mgr},8 peu à peu et en 4 jours, au bout desquels le poids ne changea plus. (La perte totale fut de 2,53 %.) 2 heures de séjour sur l'eau à la température ordinaire suffirent pour faire reprendre toute l'eau.

0^{gr},9823 du sel C se comportèrent exactement comme le sel A, perdirent une quantité insignifiante dans le vide sur l'acide sulfurique, puis rien dans le vide à 70°—75°. Après un séjour de 2 fois 48 heures dans le vide entre 110° et 115°, la perte de poids fut constante, savoir 0^{gr},0253 = 2,58 %; exposé ensuite à l'air à la température ordinaire, ledit sel récupéra en 6 heures toute son eau, en se mettant en grumeaux. Un séjour prolongé à l'air ou sur l'eau ne fit pas augmenter le poids de plus de 1—2 mgr., et en prolongeant pendant plusieurs semaines la dessiccation dans le vide sur l'acide sulfurique, la plus forte diminution du poids ne dépassa pas 1—2 mgr., ce qui était évidemment dû à l'adhérence de l'humidité.

			Trouvé	Calculé		
				A	B	C
C ₃₈	456		61,96		61,84	
H ₄₀	40		5,43		5,59	
O ₉	144		19,57			
N ₄	56		7,61	7,57	7,56	
Ca	40		5,43	5,52	5,45	
736			100,00			
H ₂ O	18		2,45	2,53		2,58

Les analyses précédentes mettent en évidence que l'acide ornithurique artificiel préparé par moi donne un sel de calcium

qui, séché à l'air, contient par atome de calcium une molécule d'eau impossible à éliminer par le vide et l'acide sulfurique et ne disparaissant qu'avec lenteur dans le vide entre 110° et 115° . Le sel déshydraté était tellement avide d'eau que j'ai constaté le fait suivant: Exposé dans un séchoir à évacuer contenant de l'air ordinaire à la température ambiante, un sel déshydraté n'avait pas tardé à s'humecter à tel point que même après avoir chauffé dans le vide entre 110° et 115° pendant 24 heures, on n'avait pas encore rééliminé toute l'eau. Dans les essais de dessiccation décrits plus haut les pesées ne furent, en conséquence, répétées qu'à 48 heures d'intervalle.

E. Fischer¹⁾, contrairement à ce qui précède, indique que le séchage dans le vide sur l'acide sulfurique enlève toute l'eau du sel calcique ornithurique racémique préparé par lui. Il n'en donne qu'une analyse, dosage du calcium, qui ne suffit pas à décider la question (il trouva 5,53 % de calcium; calculé: 5,57 % pour le sel anhydre, et 5,43 % pour l'hydraté). Quant à l'acide ornithurique optiquement actif tiré des produits naturels, Schulze et Winterstein²⁾ ont examiné le sel calcique d'un acide ornithurique obtenu par la décomposition de l'arginine; cependant ils se sont contentés d'un dosage de calcium (5,48 % de Ca), tandis que Jaffé³⁾ donne des analyses complètes de sels calciques d'un acide ornithurique tiré des excréments de poules nourries à l'acide benzoïque. Dans son mémoire M. Jaffé n'indique pas comment le sel a été séché avant l'analyse, mais, sur ma demande, ce savant a eu la bonté de m'apprendre que la dessiccation a vraisemblablement dû avoir lieu entre 105° et 110° . Les analyses de Jaffé et, en ce cas, surtout les dosages du carbone, font ressortir qu'il a analysé un sel anhydre (trouvé dans une préparation: 63,68 % de carbone, et dans une autre: 64,2 % de carbone; calculé pour le sel anhydre: 63,5 % de carbone, et pour l'hydraté: 61,96 % de carbone). La petite expérience ci-dessous, faite après réception de la communication de M. Jaffé, montre que le sel calcique sus-décrit de l'acide ornithurique artificiel contient encore 1 mol. d'eau après une dessiccation entre 105° et 110° , et contraste ainsi avec le sel calcique de Jaffé.

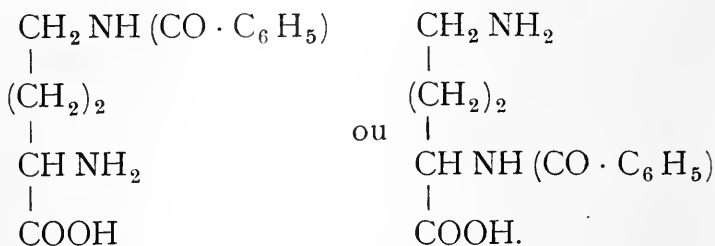
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 463 (1901).

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVI, 5 (1898).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XI, 406 (1878).

0^{gr},8126 du sel C séchés entre 108° et 110° dans un séchoir ordinaire, perdirent en 2 jours 0^{gr},0012 (d'humidité adhérente), puis, rien en 3 jours entre 108° et 110°, ni rien non plus en deux jours entre 119° et 122° durant la dessiccation dans le même séchoir; au contraire, lorsqu'ensuite on dessécha dans le vide entre 115° et 117°, la perte fut de 0^{gr},0200 en 2 jours (2,46 0/0, calculé pour 1 mol. d'eau: 2,45 0/0), et en prolongeant le séjour dans le vide entre 115° et 117°, on ne fit pas changer le poids en 2 jours; finalement, exposé à l'air, le sel desséché y reprit 0^{gr},0216 d'eau.

5. Acide monobenzoyle- α - δ -diaminovalérique
(Monobenzoyle-ornithine):



¹/₁₀₀ mol. gr. (3^{gr},4) d'acide ornithurique fut traité d'après le procédé Jaffé¹⁾ et mis avec 100 cc. d'acide chlorhydrique à 20 0/0 dans un ballon d'¹/₂ litre placé dans un bain d'huile à 140°. On chauffa pendant 2 heures, et presque tout étant dissous (le liquide était réduit alors à environ la moitié de son volume), on refroidit à l'eau frappée et filtra pour éliminer l'acide benzoïque déposé. Le liquide filtré fut évaporé au bain-marie, en ajoutant souvent de l'eau, jusqu'à production d'une masse huileuse, qu'on traita par l'eau froide à petite dose, après l'avoir refroidie à la glace. Ayant séparé par filtration l'acide benzoïque non dissous, le liquide restant fut neutralisé à l'eau ammoniacale, ce qui fit tomber la monobenzoylornithine en cristaux lamellés d'une blancheur éclatante, qu'on laissa séjourner un peu dans l'eau frappée, puis sépara par filtration et lava à l'eau frappée. Le rendement fut de 0^{gr},75, et l'eau-mère donna encore 0^{gr},16; mais le calcul ayant indiqué 2^{gr},36, on voit qu'une partie de l'acide ornithurique avait cédé les deux groupes de benzoyle. La monobenzoylornithine fut recristallisée en 30 cc. d'eau chaude, et un refroidissement lent la sépara de la solution sous forme de précipité lamellé, blanc et luisant, qui pesait 0^{gr},38 après le sé-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XI, 408 (1878).

chage à l'air et deux lavages à l'eau froide (produit I). L'eau-mère et l'eau de lavage donnèrent par évaporation 0^{gr},25 (II).

Tant I que II présentèrent au microscope des lames bien développées, souvent en parallélogrammes, ayant parfois 2 coins abattus, ce qui les rendait hexagonaux. Quelquefois les lames étaient triangulaires; mais le plus souvent les angles étaient coupés, de sorte que ces lames avaient six côtés, elles aussi. L'aspect était donc identique à ce que E. Fischer¹⁾ indique pour la monobenzoylornithine racémique préparée par lui, tandis que suivant Jaffé²⁾ ainsi que d'après Schulze et Winterstein³⁾ la monobenzoylornithine naturelle cristallise en aiguilles fines.

0^{gr},1085 de la préparation I donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 12^{cc},87 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (11,86 % d'azote, calculé 11,86 %).

0^{gr},1645 de la préparation II répondaient à 19^{cc},47 de la même solution (11,84 % d'azote).

Le point de fusion de la monobenzoylornithine naturelle est placé par Jaffé à env. 225°—230°, et par Schulze et Winterstein entre 225° et 240°, et Fischer place tout à fait pareillement celui de la combinaison racémique, «welche bei 225° erweichte, gegen 238° unter Gasentwicklung völlig schmolz». Mais cela ne cadre pas avec ce que j'ai trouvé; car, rapidement chauffés en tubes capillaires (ce qui dans le cas présent signifie, chauffés rapidement jusqu'à env. 200°, puis à raison de 10° de plus par minute), toutes mes préparations recristallisées changeaient bien d'aspect et commençaient à se contracter entre 230° et 240° (corr.), pour fondre peu à peu si l'on continuait à chauffer; mais la fusion totale avec dégagement d'air n'avait lieu qu'entre 255° et 260° (corr.). S'il était difficile de déterminer exactement le point de fusion, celui de la décomposition était très facile à préciser, et sans doute la fusion complète ne s'accomplissait qu'au moment où cette décomposition avait lieu. Que les points de fusion et de décomposition de mes préparations dussent être supérieurs à 238°, c'est ce qu'ont montré également des expériences réitérées, où le tube capillaire était chauffé de la manière décrite plus haut à 240° (corr.), puis maintenu 5 minutes entre 240° et 245° sans fusion complète, la

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 463 (1901).

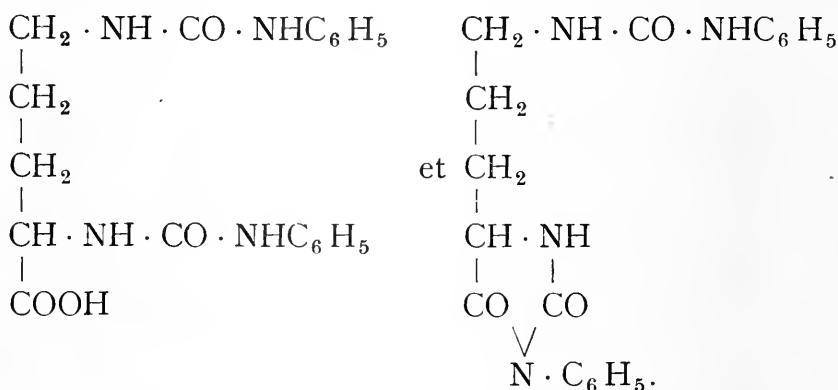
²⁾ A l'endroit cité.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVI, 5 (1898).

substance ne faisant que se contracter; mais si l'on chauffait plus fort, elle fondait entièrement dès 248° ou 250° (corr.) en dégageant de l'air.

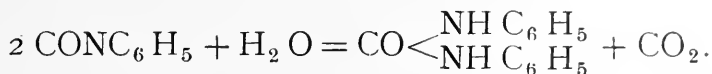
La solubilité de la substance répondait tout à fait à ce que donne Jaffé pour la monobenzoylornithine naturelle: elle se dissolvait sans difficulté dans les acides ou dans l'ammoniaque et assez facilement dans l'eau chaude (avec réaction neutre), mais difficilement dans l'eau froide et très difficilement dans l'alcool même chaud, enfin nullement dans l'éther.

6. Combinaison d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne de l'acide α - δ -diaminovalérique:



a. Combinaison d'isocyanate de phényle. $\frac{1}{50}$ mol. gr. (6^{gr},8) d'acide ^{Ser. L. 114} ornithurique fut traité par 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré dans un ballon d'1 $\frac{1}{2}$ litre tenu pendant 2 heures dans le bain d'huile en portant la température de 100° à 140°; puis on ajouta encore 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré et continua à chauffer à 140° durant 2 heures. Refroidi à l'eau frappée, le liquide laissa sur le filtre l'acide benzoïque, qu'on lava deux fois à l'eau froide; puis les liquide filtré et de lavage étant réduits par évaporation à un volume très petit, on chauffa encore dans le bain d'huile pendant 2 heures et à 140° avec 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré. L'acide chlorhydrique fut ensuite évaporé au bain-marie et laissa un résidu huileux, jaune de chlorhydrate d'ornithine, qui fut dissous en 50 cc. d'eau. La solution fut mêlée d'éther et agitée à plusieurs reprises pour en éliminer les dernières traces d'acide benzoïque; puis on chauffa au bain-marie jusqu'à disparition de l'odeur d'éther. La solution ainsi obtenue étant neutralisée par l'hydroxyde de sodium, on la mit dans une fiole de 250 cc., la refroidit bien,

puis la traita par 25 cc. de lessive de soude 2-norm. et 6^{gr},3 d'isocyanate de phényle (calculé: 20 cc. de lessive de soude et 4^{gr},8 d'isocyanate); volume total: 110 cc. Simultanément agité à la machine et refroidi à l'eau frappée, au bout d'une heure le liquide ne sentait plus l'isocyanate de phényle et avait déposé un assez fort précipité blanc de diphénylurée:



Le liquide avait encore une réaction légèrement alcaline; on y ajouta 10 cc. de lessive de soude 2-norm. et 3 gr. d'isocyanate de phényle; puis on répéta pendant une heure l'agitation et le refroidissement à la glace. Il en résulta une masse assez peu coulante, qu'on délaya dans 100 cc. d'une solution à 5 % de chlorure de sodium, après quoi on reprit l'agitation et filtra. Cette filtration fut très lente, et la diphénylurée restée sur le filtre¹⁾ dut être lavée avec une solution à 5 % de chlorure de sodium, l'eau ne donnant qu'un filtratum terne. Le mélange du liquide filtré et de l'eau de lavage faisant louchir le liquide, on le laissa jusqu'au lendemain et y vit alors un petit précipité brunâtre boursoufflé facile à filtrer. Le filtré, franchement alcalin, était presque tout à fait incolore et occupait de 500 à 600 cc. Bien refroidi, il reçut peu à peu 20 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm., ce qui fit tomber la combinaison d'isocyanate de phényle sous forme de précipité blanc caséeux, où le microscope ne montrait que des masses microcristallines. Après un repos de deux ou trois heures dans l'eau frappée, le liquide fut filtré à l'aspirateur, et le précipité déchloré par un lavage à l'eau frappée. Le rendement fut de 6^{gr},63 de substance séchée à l'air, soit près de 90 % des 7^{gr},4 calculés.

La combinaison brute était presque parfaitement pure. Presqu'insoluble dans l'eau froide, elle se laissait, bien qu'avec peine, recristalliser dans l'eau bouillante.

1 gr. de la substance fut traité, au bain d'eau bouillante, par 200 + 150 + 150 cc. d'eau, et pourtant il resta 0^{gr},65 non dissous. Un refroidissement lent des solutions obtenues, fit déposer la combinaison sous forme d'un précipité de cristaux lamellés.

¹⁾ Lavé, le précipité fut recristallisé dans l'alcool chaud et se déposa alors sous forme de beaux cristaux incolores, où le microscope montrait soit des aiguilles très minces, soit des prismes pointus et relativement épais. Le point de fusion était de 238°—239° (corr.). 0^{gr},1982 répondaient à 26 cc, 10 d'hyposulfite norm. au ¹/₁₄ (13,17 % d'azote; calculé pour la diphénylurée: 13,21 % d'azote).

La combinaison était assez soluble dans l'alcool fort, même à froid; pourtant elle se laissait très facilement recristalliser dans l'alcool de titre moyen. 6 gr. de la substance se dissolvaient en $400 + 25 + 25$ cc. d'alcool à 40⁰/₀; refroidie, puis frappée, la solution déposait le composé sous forme d'un beau précipité cristallin, qui présentait au microscope une agglomération de types foliacés, dont quelques-uns ressemblaient à des feuilles mal développées, quadrilatères et d'aspect rhomboïdal. Rendement: 5^{gr},67 de matière séchée à l'air.

Les combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne ont été tirés de l'ornithine naturelle par R. O. Herzog¹⁾, qui avait préparé cette dernière substance de l'arginine d'après la méthode de Schulze et Winterstein; de la combinaison d'isocyanate il mentionne seulement une répugnance à cristalliser.

Brute, la combinaison d'isocyanate de phényle fondait entre 185⁰ et 190⁰ (corr.), et recristallée, vers 192⁰ (corr.) avec effervescence; pourtant elle se contractait à quelques degrés au-dessous du point de fusion.

Séchées à l'air, les préparations furent desséchées dans le vide sur l'acide sulfurique avant l'analyse, mais n'y perdirent presque rien de leur poids.

0^{gr},2001 de la préparation A (brute) donnaient au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 30^{cc},10 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (15,04⁰/₀ d'azote, calculé 15,14⁰/₀).

0^{gr},1545 de la préparation B (brute) répondaient à 23^{cc},23 d'hyposulfite (15,04⁰/₀ d'azote).

0^{gr},1412 de la préparation A (recristallisée dans l'eau) répondaient à 21^{cc},40 d'hyposulfite (15,16⁰/₀ d'azote).

0^{gr},2079 de la préparation A (recristallisée dans de l'alcool à 40⁰/₀) répondaient à 31^{cc},35 d'hyposulfite (15,08⁰/₀ d'azote).

0^{gr},1374 de la préparation B (recristallisée dans l'alcool à 40⁰/₀) répondaient à 20^{cc},69 d'hyposulfite (15,06 d'azote).

0^{gr},4113 de la préparation A (recristallisée dans l'alcool à 40⁰/₀) titrés par de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.) en exigèrent 11^{cc},00, calculé 11^{cc},16.

b. Combinaison d'hydantoïne. 3 gr. de la combinaison d'isocyanate de phényle furent traités par 150 cc. d'acide chlorhydrique à 30⁰/₀ dans un ballon de 400 cc. dans le bain d'huile à 140⁰—145⁰, ce qui parfit la dissolution, partiellement après une certaine fusion. L'acide chlorhydrique bouillant depuis 20 ou 25 minutes, on versa le liquide chaud dans un gobelet en verre, et le

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. XXXIV, 525 (1902).

ballon fut rincé avec 2×25 cc. d'acide chlorhydrique à 30 %. Puis, le liquide chaud fut précipité par l'addition d'eau froide, en tout 400 cc.; mais en commençant on dut n'ajouter cette eau que lentement, et il fallut bien remuer et frotter avec une baguette en verre pour empêcher que le composé d'hydantoïne donnât un précipité huileux, et l'on obtint ainsi un beau précipité blanc caséeux, où le microscope présentait des groupes d'aiguilles seulement. Après deux heures de repos, le liquide fut filtré à l'aspirateur et déchloré par un lavage à l'eau froide. Rendement: 2^{gr},6 de matière séchée à l'air, soit 90 % des 2^{gr},85 de la théorie.

Pour purifier on fit dissoudre 2 gr. de la combinaison brute dans 60 + 15 + 15 cc. d'alcool absolu chaud, et le refroidissement de la solution redonna un très volumineux précipité, où le microscope montra exclusivement des aiguilles fines comme des cheveux. Complètement refroidi, le liquide fut filtré à l'aspirateur et 4 fois lavé à l'alcool. Rendement: 1^{gr},4; mais le reste put être recouvré en évaporant l'alcool et ajoutant de l'eau en même temps.

Brute, la combinaison d'hydantoïne était fusible à 192°—193° (corr.), recristallisée, entre 194° et 195° (corr.).

La combinaison d'hydantoïne tirée de l'ornithine naturelle est décrite par R. O. Herzog¹⁾ sous le même aspect et comme fondant au même point (191°—192°) (déc.) que je l'ai indiqué pour la combinaison racémique.

Avant d'analyser, on dessécha la matière dans le vide à 110°; elle n'y perdit pas de poids appréciable.

0^{gr},1387 de la préparation A (brute) donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 21^{cc},80 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (15,72 % d'azote, théorie 15,91 %).

0^{gr},1175 de la préparation B (brute) correspondaient à 18^{cc},42 de la même solution d'hyposulfite (15,68 % d'azote).

0^{gr},1095 de la préparation A (cristallisée de nouveau) répondaient à 17^{cc},30 de la même solution d'hyposulfite (15,80 % d'azote).

0^{gr},1658 de la préparation B (recristallisée) équivalaient à 26^{cc},17 de la même solution (15,78 % d'azote).

Ce qui précède, révèle la différence suivante entre l'ornithine optiquement active étudiée par Jaffé, Schulze et Winter-

¹⁾ A l'endroit cité.

stein ainsi que Herzog, d'une part, et l'acide α - δ -diaminovalérique que j'ai préparé, d'autre part¹⁾:

1° L'acide ornithurique optiquement actif fond un peu plus tôt que l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique.

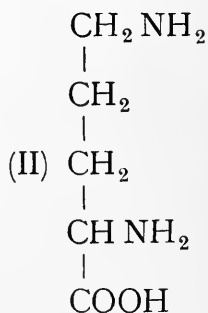
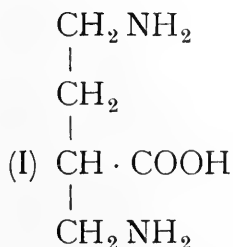
2° Le sel calcique de l'acide ornithurique est anhydre, tandis que celui de l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique contient une molécule d'eau pour chaque atome de calcium.

3° L'ornithine monobenzoylique optiquement active cristallise en aiguilles et fond tout à fait au-dessous de 240° ; la préparation correspondante: le substitut monobenzoylique de l'acide α - δ -diaminovalérique racémique, cristallise en feuilles et ne fond complètement qu'entre 255° et 260° .

4° D'une part, la combinaison de l'ornithine optiquement active avec l'isocyanate de phényle ne cristallise que difficilement, et d'un autre côté, la combinaison d'isocyanate de phényle avec l'acide α - δ -diaminovalérique racémique cristallise facilement et donne des types foliacés faciles à reconnaître.

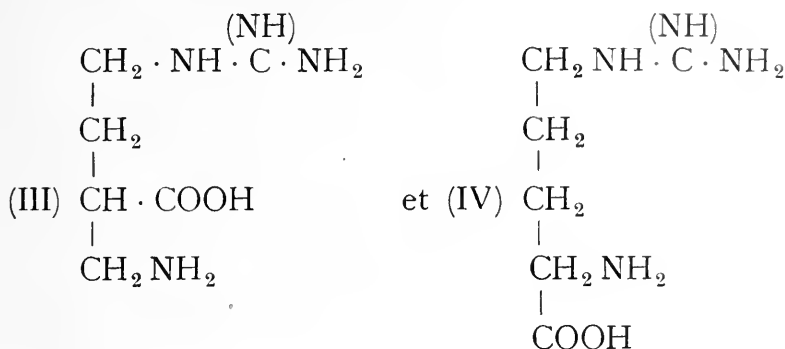
Vu la petitesse des différences en question, il se peut, il est même vraisemblable, que l'acide ornithurique de Jaffé soit une modification optiquement active de l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique; mais cette hypothèse n'est pas un fait avéré. J'ai l'intention d'en chercher une preuve en décomposant l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique racémique en ses constituants optiquement actifs, et j'emploierai à cet effet un alcaloïde convenable; c'est par cette voie que durant ces dernières années Fischer est parvenu à de beaux résultats en dédoublant des substitués benzoylés d'une série d'acides monoamidés.

La poursuite à fond de cette preuve est importante; car les faits jusqu'ici acquis se prêtent aussi bien à l'interprétation par la première que par la seconde des deux formules ci-après de l'ornithine de Jaffé:

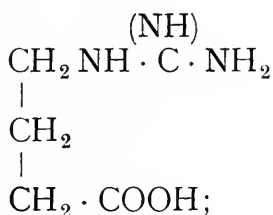


¹⁾ Quant à mes divergences d'avec E. Fischer pour l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique, voir pages 51 et 53.

Toutes deux expliquent comment Ellinger¹⁾, en se servant de bactéries de putréfaction, a pu scinder l'ornithine en acide carbonique et tétraméthylènediamine. Les deux formules correspondantes de l'arginine:



expliquent comment l'oxydation de l'arginine a pu donner à Fr. Kutscher²⁾ la formation tant de la guanidine que de l'acide guanidino-butyrique:



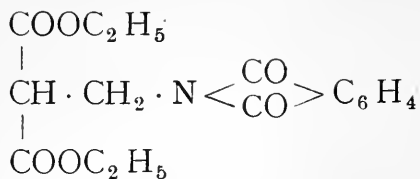
par l'oxydation ultérieure de ce dernier acide il a obtenu l'acide succinique. On est prédisposé à considérer le groupe carboxylique de l'ornithine comme lié au même atome de carbone que l'un des groupes NH_2 ; c'est naturel, car, de fait, il se produit toujours des acides α -amidés, tandis que les acides β -amidés n'ont jamais été observés avec certitude parmi les produits de la décomposition des protéines.

Il va de soi que pour préparer le susdit acide (I), qui est isomère avec l'acide α - δ -diaminovalérique, on ne peut pas employer l'éther phtalimidomalonique comme point de départ; mais j'espère que l'éther sodomalonique et le monobromométhyle-phtalimide de Franz Sachs³⁾ me feront obtenir un produit:

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie XXIX, 334 (1900).

²⁾ Ibid. XXXII, 413 (1901).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXI, 1229 (1898).

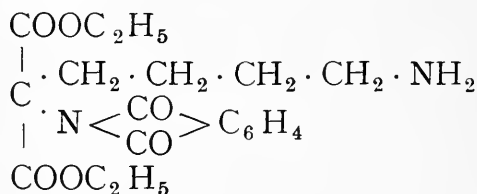


susceptible de donner naissance à cet acide comme aux acides analogues.

Appendice.

A propos de la synthèse de l'acide α - ϵ -diaminocaproïque récemment publiée par E. Fischer et F. Weigert¹⁾ et des recherches de R. Willstätter²⁾ sur les dérivés de l'acide diaminoacétique et de l'acide diaminomalonique, je terminerai par une communication provisoire concernant quelques-unes de mes recherches sur la synthèse des acides α - ϵ -diaminocaproïque et α - α -diaminoacétique.

Acide α - ϵ -diaminocaproïque. En réduisant, par le sodium brillant, une dissolution dans l'alcool absolu de l'éther butyronitrile-phtalimidomalonique décrit plus haut (voir p. 22), puis décomposant par l'acide chlorhydrique le produit de la réduction:



on a réussi facilement à obtenir le chlorhydrate de l'acide α - ϵ -diaminocaproïque; mais le rendement ne répondait pas parfaitement à l'attente. J'espère qu'en modifiant les conditions des expériences je pourrai y remédier, et alors je publierai en un ensemble mes recherches sur cette question. Ici je me bornerai à dire que pour isoler l'acide α - ϵ -diaminocaproïque, j'ai employé la méthode A. Kossel et F. Kutscher³⁾ en précipitant par l'acide phosphotungstique, puis transformant en picrate le phosphowolframate épuré par un lavage; enfin purifiant ce picrate par recristallisation en eau chaude.

Le picrate obtenu et le picrate de lysine tiré de la gélatine,

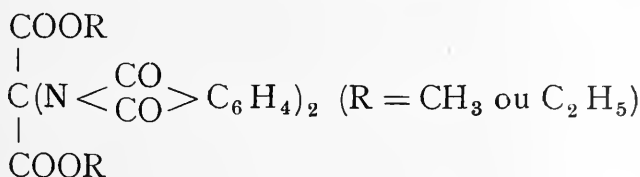
¹⁾ Sitzungsberichte der Berl. Akad. 1902, 270.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXV, 1378 (1902).

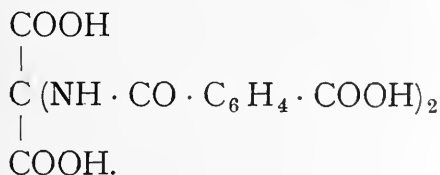
³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. XXXI, 175 (1900).

ont fourni, d'après la méthode de Herzog¹⁾, les combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne, et alors on a constaté des rapports analogues à ceux de plus haut (voir p. 56) à propos de l'acide α - δ -diaminovalérique et de l'ornithine. En effet, d'une part, la combinaison d'isocyanate de phényle de la lysine naturelle répond au signalement qu'en donne Herzog et ne cristallise pas volontiers, et de l'autre côté, la combinaison racémique d'isocyanate de phényle se prêtait à la cristallisation, et en recristallisant dans l'alcool à 40 0/0, elle se déposait en groupes d'aiguilles pointues, parfois un peu aplaties (fondant à env. 193° [corr.]). Les combinaisons hydantoïniques de la lysine tant « artificielle » que naturelle cristallisaient en aiguilles longues et minces, tout à fait comme l'ont décrit Herzog, Fischer et Weigert. Recristallisé dans l'alcool et séché dans le vide à 107°, le composé hydantoïnique racémique fondait à env. 187° (corr.); Fischer et Weigert lui assignent 185° (corr.). La combinaison hydantoïnique de la lysine naturelle fond d'après Herzog entre 183° et 184° (déc.); Fischer et Weigert disent: 196° (corr.), et en faisant cette préparation j'ai trouvé 194°—195° (corr.).

Acide α - α -diaminoacétique. En traitant convenablement par le phtalimide potassique le dibromomalonate de méthyle ou d'éthyle, on a produit l'éther diphtalimidomalonique:

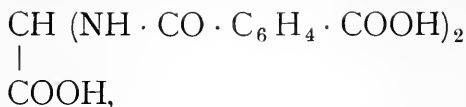


qui, dissous dans une solution d'hydroxyde de sodium ensuite sursaturée par l'acide chlorhydrique, donna l'acide tétrabasique:



Ce dernier, par simple chauffage dans une solution aqueuse, s'est scindé en abandonnant de l'acide carbonique, probablement avec formation d'une solution aqueuse de l'acide tribasique:

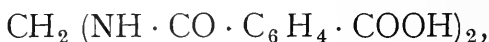
¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. XXXIV, 525 (1902).



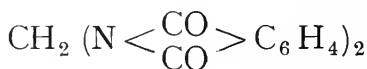
que je n'ai pourtant pas encore préparé à l'état solide. La solution aqueuse de cet acide tribasique s'est montrée fort instable; car, simplement exposée au froid, elle déposait du phtalimide. En traitant par l'acide chlorhydrique le susdit acide tétrabasique, je n'ai pas non plus réussi à produire l'acide diaminoacétique, ni mieux à constater avec pleine certitude la présence de l'acide

iminoacétique: $\begin{array}{c} \text{CH} = \text{NH} \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$; mais je me propose de reprendre cette question.

J'y relie une recherche que j'ai commencée sur les produits de la décomposition de la solution de l'acide méthylènediphtalamique:

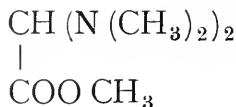


dans l'eau ou dans l'acide chlorhydrique; cet acide est facile à obtenir du méthylènediphtalimide:



découvert par A. Neumann¹⁾.

Sans entrer dans d'autres détails sur l'étude qu'on a esquissée plus haut, je me bornerai à faire remarquer certain phénomène intéressant. Après avoir trouvé que l'éther tétraméthyldiaminoacétique



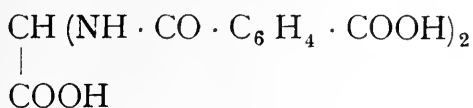
préparé par lui est très instable en contact des alcalis et des acides — contrastant ainsi avec l'acide obtenu par E. Drechsel²⁾ en dédoublant la caséine et conçu par lui comme acide diaminoacétique —, R. Willstätter³⁾ émet l'opinion que le produit de dédoublement obtenu par Drechsel ne pouvait pas être l'acide diaminoacétique. Elles aussi, mes expériences parlent dans ce sens-là; car, en songeant à l'extraordinaire facilité et spontanéité avec lesquelles les sus-mentionnées combinaisons de l'acide phtala-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXIII, 1002 (1890).

²⁾ Ber. d. math.-physik. Kl. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss. 1892, 116.

³⁾ A l'endroit cité.

mique: $R \cdot NH \cdot CO \cdot C_6H_4 \cdot COOH$ se décomposent quand on les traite par l'acide chlorhydrique et forment le composé amidé $R \cdot NH_2$ et l'acide phtalique, on ne voit aucune raison pour que, traité par l'acide chlorhydrique, le susdit acide tribasique:



ne donne pas les acides phtalique et diaminoacétique, supposant que ce dernier puisse réellement, à l'instar du produit découvert par Drechsel, de la décomposition de la caséine, supporter un traitement même fort par l'acide chlorhydrique.

Messieurs mes aides Jessen-Hansen, C. Pedersen et Weis, qui m'ont diversement appuyé de leur importante assistance dans l'exécution de ce travail, sont priés de recevoir encore ici mes meilleurs remerciements.

Novembre 1902.

ÉTUDE SUR LES BACTÉRIES DITES SARCINES ET SUR LES MALADIES QU'ELLES PROVOQUENT DANS LA BIÈRE

PAR

N. HJELTE CLAUSSEN.

UN groupe des Sphérobactéries qui se rencontrent dans les brasseries, ont d'abord été décrites sous la désignation commune de Sarcina, et c'est encore sous ce nom qu'elles sont connues et redoutées aujourd'hui dans l'industrie brassicole. Plus tard, Balcke a proposé la dénomination de *Pediococcus* pour les bactéries globulaires dont le cloisonnement des cellules se fait suivant deux directions de l'espace, par opposition aux Sarcines proprement dites, dont le cloisonnement se fait dans trois directions. Dans ce qui va suivre, j'ai maintenu cette distinction; toutefois, pour ne pas m'écarter de la terminologie généralement reçue, j'ai gardé la dénomination de »maladies de Sarcina«, bien que les maladies en question ne soient point dues à des bactéries pouvant être mises au nombre des Sarcines proprement dites.

Le zymologue travaillant pour l'industrie brassicole devra presque inévitablement faire face à la question des Sarcines. Or, quiconque s'occupe de cette question, ne tarde pas à reconnaître qu'aujourd'hui encore elle est pendante. Si l'on s'en tient aux manières de voir généralement admises jusqu'ici et qui s'appuient surtout sur des travaux de Lindner¹⁾, Reichard²⁾ et Schön-

¹⁾ Die Sarcina-Organismen der Gärungsgewerbe. Dissertation. Berlin 1888. Se trouve aussi dans les »Nachrichten über den Verein: Versuchs- und Lehranstalt in Berlin«, 1888.

²⁾ Zeitschrift für das gesamte Brauwesen 1894, p. 257. 1895, p. 59 et 293. 1901, p. 301.

feld¹⁾) [ce dernier en a donné un aperçu dans une conférence faite en 1898 devant l'assemblée générale de la »Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei« de Berlin²⁾], on croirait que le moyen le plus facile de découvrir la source d'une contamination sarcinique, serait de faire les cultures dont il s'agit dans de l'eau de levure ammoniacale ou solutions analogues. En agissant ainsi, on trouvera presque partout: dans l'air et sur la terre, dans les poussières et dans les fumures, dans les détritrus d'orge et dans le malt vert, des Sarcines et des Pédiocoques qui, il est vrai, selon les recherches faites jusqu'à ce jour³⁾, ne peuvent se développer dans la bière pasteurisée, mais qui n'en sont pas moins regardés comme susceptibles de nuire à la bière après s'y être »acclimatés«. Or, si l'état des choses était bien réellement aussi défavorable, il n'y aurait évidemment aucun moyen de tenir une brasserie à l'abri des infections: même avec la propreté la plus rigoureuse et les soins les plus méticuleux apportés à la fabrication, l'on aurait infailliblement le dessous en face d'un ennemi aussi omniprésent.

Ce sont des considérations de cet ordre qui m'ont porté à vérifier l'exactitude des opinions prédominantes et à attaquer la question par la base. Bien que le but principal que j'avais en vue fût de nature purement pratique, il m'a fallu commencer par des travaux de nature plutôt théorique. Ce sont les résultats scientifiques et pratiques obtenus dans ces recherches que je vais communiquer ci-dessous. Pour point de départ j'ai pris des bières affectées de la maladie de Sarcine, et en infectant des bières saines et pasteurisées, je me suis toujours assuré que mes cultures engendrées d'une seule tétrade étaient capables de provoquer à nouveau la même maladie. Dans mes recherches j'ai fait une distinction entre les Pédiocoques de la bière — c'est-à-dire ceux qui se développent dans la bière et peuvent la rendre malade — et, d'autre part, les autres Pédiocoques qui, il est vrai, sont semblables aux précédents au point de vue morphologique, mais qui n'ont pas d'importance pour l'industrie brassicole. De plus, j'ai pu constater l'existence d'espèces diverses

¹⁾ Wochenschrift für Brauerei 1897, p. 177. 1898, p. 285 et 321. 1899, p. 665 et 681. 1901, p. 297.

²⁾ Jahrbuch der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin. 1898.

³⁾ Voir en particulier Schönfeld: Wochenschrift für Brauerei. 1899, p. 681.

entre les Pédiocoques de la bière. Il nous restera à appliquer la base théorique que mes recherches auront procurée, à un examen des phénomènes qui se présentent en brasserie. Cette dernière partie de ma tâche sera traitée dans un travail ultérieur.

I. Isolation des Pédiocoques qui se trouvent dans la bière et dans la levure.

Pour isoler des Pédiocoques de bière j'ai trouvé convenable de me servir de moût gélatinisé à réaction légèrement acide et que j'avais préparé en mêlant $7\frac{1}{2}\%$ de gélatine dans du moût houblonné de bière de garde marquant environ 13,5 % Balling. Dans ce milieu les Pédiocoques de bière se développent sûrement, bien qu'avec lenteur, et il s'agit simplement d'ensemencer sur une plaque une quantité tellement petite de la bière que parmi les taches de végétation formées avec une rapidité relative par les autres microorganismes il y ait encore assez de place pour les colonies de Pédiocoques, qui ne deviennent visibles à l'œil nu qu'au bout de 10 à 15 jours à la température ordinaire d'un appartement.

Cependant, s'il existe dans la bière des organismes qui liquéfient la gélatine ou qui en couvrent la surface, on ne pourra, règle générale, isoler les Pédiocoques au moyen d'une culture ordinaire sur plaque. Dans ce cas j'ai mis à profit le fait que les Pédiocoques de la bière sont tués moins facilement que la plupart des organismes qui les accompagnent, quand on les soumet à un traitement par des solutions aqueuses de fluorhydrate de fluorure d'ammonium. Ce sel se compose de molécules égales de fluorure d'ammonium et de l'élément qui agit en ce cas: l'acide fluorhydrique.

Abandonnées dans des verres pendant un espace de temps aussi court que $\frac{1}{2}$ heure, les solutions très faibles dont il s'agit ici, ne subissent pas d'altération sensible, tandis que, de l'autre côté, elles ont perdu le pouvoir de tuer la levure au bout de 24 heures de repos dans du verre ordinaire. Par conséquent, il faut conserver les solutions de ce sel dans des bocalx soigneusement paraffinés ou bien dans des réservoirs de gutta-percha, à moins que l'on ne préfère préparer une solution fraîche chaque

fois qu'on en a besoin. Par contre, on peut sans inconvénient laisser la solution agir sur la bière dans des bocaux ordinaires non paraffinés, parce que l'effet qu'on a en vue se produit déjà au bout de très peu de temps.

Le procédé ci-après a paru mener au but: On mélange en remuant, dans un bocal, des volumes égaux de bière renfermant des Pédiocoques et d'une solution de fluorhydrate de fluorure d'ammonium à 1—1½ %. Puis, on laisse reposer pendant ½ heure à la température ordinaire du laboratoire, après quoi une goutte de ce mélange est disséminée dans du moût gélatinisé. Au bout de 7 ou 8 jours à une température de 25 ° C., ou après 10 à 15 jours à celle de la chambre, les Pédiocoques, s'il y en a, auront formé dans la gélatine des taches visibles, qui même pendant un séjour prolongé demeurent toutes petites. Parmi les autres organismes qui se rencontrent généralement dans la bière, certaines espèces de *Torula* et de bactéries en forme de bâtonnets peuvent, il est vrai, survivre au traitement par le fluorure d'ammonium; mais dans aucun des cas considérés leur nombre n'a été assez grand pour empêcher une isolation commode des Pédiocoques.

Le procédé a été vérifié sur les bières suivantes, qui toutes avaient séjourné en bouteilles pendant quelque temps et renfermaient en abondance de Pédiocoques à côté de divers autres microbes:

Nos	Sortes de bière	Développements sur la gélatine:
1	Bière danoise de garde	Exclusivement des Pédiocoques
2	Bière de Munich	Quelques rares bâtonnets, des Pédiocoques en grand nombre
3	Bière de Dortmund	Un nombre minime de bâtonnets, de nombreux Pédiocoques
4	Bière du type de Munich, brassée aux États-Unis d'Amérique	Bâtonnets et Pédiocoques
5	Double Brown Stout, de Londres	Quelques rares <i>Torula</i> , de nombreux Pédiocoques

On a transporté dans de la bière pasteurisée une colonie de Pédiocoques obtenue de cette manière, en prenant garde à ce que la colonie ne fût pas englobée dans la gélatine. Au bout

de 2 à 3 semaines à la température de la chambre, elle a produit dans la bière des phénomènes morbides analogues à ceux qu'on avait constatés dans l'échantillon original de bière. Les *Pédiocoques* des cinq bières indiquées ci-dessus peuvent se classer en deux groupes:

Les *Pédiocoques* originaires des N^{os} 1 et 5, donnaient à la bière une odeur et un goût désagréables, mais ne la rendaient pas trouble. Ils croissaient au fond de la bouteille, où ils formaient un dépôt insignifiant.

Ceux provenant des N^{os} 2, 3 et 4, causaient la même altération de l'odeur et du goût de la bière, mais la troublaient en même temps; car ils apparaissaient durant une certaine phase en forme de tétrades isolées suspendues dans le liquide.

Ainsi que nous en parlerons dans la suite, les 5 *Pédiocoques* isolés se sont maintenus constants tant au point de vue de leur action sur la bière que sous d'autres rapports aussi, et nous pouvons en distinguer deux espèces bien nettement différentes auxquelles, en considération de la façon dont elles se comportent vis-à-vis de la bière, j'ai donné les noms de *Pediococcus damnosus* (N^{os} 1 et 5) et *Pediococcus perniciosus* (2, 3 et 4).

Vu que le traitement par le fluorhydrate de fluorure d'ammonium dont je viens de parler, s'est trouvé applicable à l'isolation de *Pédiocoques* provoquant des maladies dans la bière et provenant de cinq bières arbitrairement choisies et différant beaucoup par leurs provenance et caractère, on peut regarder comme probable que tous les vrais *Pédiocoques* de la bière ordinairement trouvés dans ce liquide font preuve du même pouvoir relatif de résistance au fluorhydrate de fluorure d'ammonium.

Le procédé que je viens de décrire s'adapte éminemment à séparer les *Pédiocoques* d'avec les levures, puisque celles-ci sont tuées très facilement par le fluorure susdit. Conséquemment, le cas échéant, on est en état de constater avec sûreté même une très légère infection par des *Pédiocoques*, quand elle se produit soit dans un appareil propagateur de la levure, soit dans une cuve de fermentation. Dans ce dernier cas on peut délayer 2 à 3 g. de levure épaisse comme

la bouillie dans un bocal non paraffiné contenant 10 cc. d'une solution de fluorhydrate de fluorure d'ammonium à $1/2$ ‰, et la laisser reposer pendant $1/2$ heure, après quoi l'on en transporte 2 ou 3 gouttes dans le moût gélatinisé. Pourvu que l'on ait eu soin de répartir complètement la levure dans le liquide en remuant fortement, on n'obtient dans la gélatine qu'un développement de Pédiocoques. J'ai eu mainte occasion de me convaincre de la précision de cette méthode. Elle permet de constater aisément l'existence de Pédiocoques dans la levure en quantités tellement minimes que même par un examen rigoureux au microscope un observateur expérimenté ne peut pas les découvrir. Bien entendu, ce procédé demande trop de temps pour être applicable par exemple au choix de levure d'ensemencement de cuve en cuve; mais toutes les fois qu'il s'agit de constater si un échantillon de levure est parfaitement exempt de Pédiocoques, ou bien de poursuivre une infection naissante, ladite méthode rend de bons services et doit toujours être employée.

Un examen provisoire ayant montré que les 5 Pédiocoques se laissaient classer dans les deux espèces mentionnées plus haut, j'ai choisi pour objet d'une recherche plus approfondie l'espèce provenant de la bière de garde danoise et celle provenant de la bière de Dortmund. Ces représentants de chacune des deux espèces ont fourni de quoi préparer des cultures absolument pures, c'est-à-dire des cultures préparées en prenant pour point de départ une seule tétrade contrôlée au microscope. La difficulté que présente une telle culture pure de bactéries, à cause de l'extrême petitesse des individus, se trouve ici supprimée en partie par suite de la forme bien nettement caractéristique de la tétrade et, de plus, on peut atténuer cette difficulté en ne prenant pour chaque opération qu'une dose de gélatine infectée assez petite pour être contenue dans un seul champ du microscope.

La végétation de *Pediococcus* provisoirement isolée par le procédé décrit ci-dessus ayant rendu la bière pasteurisée malade par infection, on en a transporté une quantité convenable dans du moût gélatinisé fondu; les amas de Pédiocoques renfermés dans cette portion de bière avaient été préalablement bien secoués afin de disjoindre les tétrades dont ils étaient formés. La dilution a été réglée de façon qu'une toute petite gouttelette renfermât, en terme moyen, une tétrade seulement, et une série

de ces petites gouttes ont été placées à la surface inférieure de leurs couvre-objet respectifs et examinées au microscope. Alors, quand on n'a trouvé dans une goutte qu'une tétrade d'aspect typique, et une seule, on a marqué l'emplacement de cette goutte à la face supérieure du couvre-objet, et on l'a recouverte d'une goutte plus grosse de moût gélatinisé et stérilisé, justement en train de se solidifier, après quoi on a luté le couvre-objet à l'anneau de la chambre humide. Dans certaines chambres la tétrade ne s'est pas développée du tout, et d'autres ont dû être rejetées parce que des *Pédiocoques* m'avaient échappé, de sorte que plus d'une colonie s'est développée; mais dans les chambres restantes la tétrade marquée a développé une tache de végétation, et cette tache a permis d'infecter à coup sûr un milieu nutritif frais. La division cellulaire a commencé au bout de 3 ou 4 jours à la température de la chambre, et les colonies sont devenues visibles à l'œil nu dans la huitaine. Une pareille colonie a fourni des matériaux pour une culture par piqure en moût gélatinisé, et à l'aide de celle-ci on a d'abord infecté les autres milieux nutritifs.

II. Morphologie.

Je n'ai pu amener ni *Pediococcus damnosus* ni *Pediococcus perniciosus* à prendre la forme propre aux *Sarcines*. Quelles que soient les conditions extérieures et les milieux nutritifs dans lesquels je les ai cultivées, les deux espèces que je viens de nommer ont toujours apparu dans les mêmes formes que la bière nous montre, c'est-à-dire des tétrades et des dyades. Quand une tétrade isolée dans du moût gélatinisé commence à se scinder, il s'opère bien vite des déplacements tellement considérables entre les cellules que le tout se façonne en un amas confus de forme essentiellement globulaire, dans lequel il est impossible de suivre le développement des cellules individuelles.

D'un côté, je n'ai pu observer aucune agglomération régulière; de l'autre, les préparations provenant de cultures faites dans des milieux liquides présentent ordinairement des amas irréguliers formés par un nombre variable de tétrades et de dyades groupées d'une façon assez confuse. C'est dans leur tendance plus ou moins marquée à former de pareils amas qu'il faut chercher un

caractère distinctif entre la végétation de *Pediococcus damnosus* et celle de *Pediococcus pernicius*. Le premier possède cette tendance à un haut degré, tandis qu'elle manque, ou peu s'en faut, dans l'autre. Voilà précisément la cause de la façon différente dont ils se comportent en croissant dans la bière.

La différence se manifeste non seulement dans les bières, mais aussi d'une manière très nettement prononcée dans le moût houblonné. Si l'on infecte avec le *Pediococcus damnosus* un pareil moût contenu dans un flacon *Freudenreich* et qu'on laisse le flacon en repos sans le secouer, il s'y formera au fond de petits amas aux contours nettement définis, bien qu'un peu irréguliers. Ces amas croissent tant en hauteur que latéralement, et finissent par ressembler à de petites verrues. Le moût lui-même demeure limpide pendant plusieurs jours après l'apparition des amas. Il est vrai que plus tard il se trouble; mais loin d'être dû à des *Pédiocoques* nageant dans le liquide, ceci est au contraire le résultat d'une production d'acide. Si l'on neutralise cet acide au fur et à mesure qu'il se forme, le moût ne s'altère point, mais demeure tout à fait clair.

Quant au *Pediococcus pernicius*, il se comporte tout autrement. Dès le commencement de son développement, cette espèce produit dans le moût un trouble très prononcé en l'emplissant d'une foule de tétrades et dyades qui flottent librement, et il en est ainsi même si l'on neutralise l'acide qui s'est formé. En même temps il se forme au fond du flacon des taches plates et étendues sans contours bien définis et qui n'atteignent pas de hauteur appréciable. Ces taches se soudent peu à peu en croissant de manière à former une couche homogène et uniformément répandue.

Dans d'autres liquides nutritifs on rencontre des divergences analogues, bien que moins fortement accusées, dans le mode de croissance de ces deux espèces.

Une jeune culture du *Pediococcus damnosus* dans du moût est formée d'amas irréguliers, se composant souvent d'innombrables tétrades et dyades, tandis que le *Pediococcus pernicius* apparaît ou en forme de tétrades et dyades isolées ou bien comme amas d'une étendue beaucoup moins grande. L'agglutinant qui les retient ensemble, n'est pas dissout par les acides dilués, mais il l'est facilement par les alcalis en dilution. Si, prenant une goutte de lessive de soude étendue, on la fait

entrer dans une préparation de *Pediococcus damnosus*, on verra qu'au fur et à mesure que la lessive pénétrera, tous les amas se désuniront pour s'éparpiller comme des tétrades et dyades isolées. Il en est de même dans une préparation de *Pediococcus perniciosus*, quoique à un degré moindre, soit parce que les amas sont plus petits, soit aussi parce que la matière qui les cimente semble se dissoudre moins complètement, de telle sorte qu'après l'addition de la lessive on trouve encore de petits amas de 2 à 4 tétrades chacun.

Quant aux tétrades, elles paraissent, en moyenne, un peu plus grandes dans le *Pediococcus damnosus* que dans le *Pediococcus perniciosus*. Cependant, la différence d'un côté des tétrades des deux espèces est tellement exigüe — seulement 0,1 à 0,2 μ — qu'elle ne nous fournit pas de caractère distinctif, d'autant moins que la grandeur peut varier considérablement dans la même espèce selon le mode de culture. C'est ainsi que dans le *Pediococcus damnosus* le côté de la tétrade a affecté par exception une longueur de 1,8 μ d'une part et de 3,5 μ de l'autre, alors que le chiffre ordinaire est de 2,6 à 2,8 μ .

Le *Pediococcus perniciosus* montre un phénomène caractéristique dans des cultures vieilles. Un examen microscopique du dépôt des cultures en moût âgées de 3 mois ou plus, fait découvrir dans l'une et l'autre espèce une foule de corpuscules granuleux, les uns des *Pédiocoques* morts, d'autres des sécrétions du moût, sans qu'il soit possible de les rapporter avec certitude par une observation directe à l'une ou l'autre de ces deux catégories. Si, par contre, on fait entrer sous le bord du couvre-objet un peu de lessive de soude diluée, les sécrétions provenant du moût se dissoudront. Une préparation de *Pediococcus damnosus* est donc encore remplie d'une foule de tétrades isolées, tandis que dans une préparation de *Pediococcus perniciosus* on n'observe généralement plus de corps solides, ou tout au plus quelques rares corpuscules plus réfringents que le liquide. Par conséquent, dans des cultures en moût de *Pediococcus perniciosus* âgées de 3 mois, les cellules se sont transformées au point que par un traitement à la lessive de soude elles se dissolvent tout simplement. Par contre, les cultures du *Pediococcus damnosus* dans le moût, même après 8 mois de repos, ne montrent aucune trace d'une pareille transformation.

Dans certaines circonstances, qu'on trouvera indiquées ci-dessous, les deux espèces de *Pediococcus* qui nous occupent, affectent la forme de zooglées.

III. Physiologie.

Tant le *Pediococcus damnosus* que le *Pediococcus pernicius* se développent dans les liquides nourriciers légèrement acides ou neutres ordinairement employés. L'une et l'autre espèce peuvent également se développer dans des liquides assez fortement acides. Si, au contraire, le liquide nutritif contient un alcali libre, même en proportion minime, tout développement se trouve enrayé.

La façon dont les deux espèces se comportent vis-à-vis de la bière, présente un intérêt tout particulier. J'ai pasteurisé à 60° dans des bouteilles de $\frac{1}{4}$ l. et munies d'un fermoir métallique à arc. Il est assez commode d'opérer avec de telles bouteilles; car elles permettent de nettoyer à la flamme tant le bouchon que le goulot, et ensuite de les ouvrir dans la caisse stérile sans toucher autre chose que le levier du fermoir. En effet, le bouchon est soulevé par la pression de l'acide carbonique. Puis, lorsque la bière a été infectée, on peut également avec facilité fermer la bouteille sans qu'il y ait chance de contamination étrangère. Tant le *Pediococcus damnosus* que le *Pediococcus pernicius* se développent sans difficulté dans la bière pasteurisée de la manière indiquée. Lorsque j'ai effectué l'infection par des cultures jeunes dans du moût houblonné ou non houblonné ou bien dans un mélange de ces liquides avec de la gélatine, elle n'a jamais manqué, et même faite avec des végétations tirées des cultures en eau de levure ou en bouillon additionné de peptone, elle a réussi généralement, bien que pas toujours. Cependant, dans les cas les plus favorables, le développement met une quinzaine de jours à se manifester d'une façon bien nette, parfois même 5 à 6 semaines. En secouant fréquemment les bouteilles, on favorise à un haut degré le développement.

Ainsi que je l'ai déjà dit, le *Pediococcus pernicius* commence par ternir un peu la bière, puis la trouble plus ou moins, jusqu'à ce qu'un repos prolongé ait amené une nouvelle clarification. Par contre, le *Pediococcus damnosus* laisse la bière claire

et ne produit qu'un petit dépôt assez insignifiant. L'une et l'autre espèce communiquent ordinairement à la bière les mêmes goût et odeur désagréables; toutefois, comme cela était à attendre, ceux-ci ne sont pas prononcés au même degré dans toutes les bières, et il en existe même dans lesquelles ils sont tout-à-fait imperceptibles. En se développant dans de telles bières, ce n'est que le *Pediococcus perniciosus* qui y provoque des phénomènes morbides; l'autre espèce ne le fait point.

Comme on le sait, il a été établi plusieurs fois par des chercheurs très exacts que des bactéries qui s'accordent tout-à-fait morphologiquement avec celles dont nous nous occupons, peuvent apparaître sur une grande échelle dans les brasseries sans provoquer de maladie dans la bière. J'ai trouvé la confirmation de cette observation dans mes recherches. En effet, j'ai pu constater que le *Pediococcus damnosus* peut exister abondamment par ex. dans la «bière de Pilsen» d'une grande brasserie danoise sans faire aucun mal à la bière, tandis que cette même espèce produisait des phénomènes manifestes de maladie (odeur et goût mauvais) dans une bière similaire d'une autre brasserie. Cela fait donc voir et apprécier l'aptitude de la bière elle-même à déterminer si la maladie se manifestera ou non.

Nous avons vu qu'il peut s'écouler des temps inégaux avant que de différentes cultures d'un seul et même *Pediococcus* se développent sensiblement dans la bière. Les cultures tirées du moût s'y développent plus vite que celles provenant de l'eau de levure ou du bouillon additionné de peptone, et les cultures jeunes évoluent plus rapidement que les anciennes. Il peut naturellement arriver aussi qu'en raison de son âge ou du mode de culture employé, une culture n'arrive point du tout à se développer dans une bière; mais pourvu qu'un développement ait lieu, le résultat final est toujours essentiellement le même pour une seule et même sorte de bière. Quel que soit le temps qu'il y faille, le *Pediococcus perniciosus* rendra toujours la bière trouble, si tant est qu'il puisse s'y développer. Une bière peut se troubler plus qu'une autre; mais une seule et même bière ne présente pas à cet égard de plus grandes différences que ne le feront aussi sous d'autres rapports les contenus de deux bouteilles ayant la même bière.

Les opinions prédominantes relatives à la «virulence» chan-

geante des *Pediococcus* vis-à-vis de la bière, me semblent donc ne pouvoir pas s'appuyer sur les faits constatés.

La notion de «virulence» a été empruntée au domaine des bactéries pathogènes, et par analogie des phénomènes qu'il nous montre, l'apparition des *Pédiocoques* à l'état «virulent» ou «non virulent» signifierait qu'un seul et même *Pédiocoque*, qui en certains cas provoque certains phénomènes morbides par sa croissance dans une bière quelconque, devait dans d'autres cas (soit quand on l'a cultivé d'une autre manière) pouvoir croître dans la même bière sans la rendre malade. Mais je n'ai rien pu constater de pareil, et aucune autre source non plus n'a, que je sache, fourni des bases sûres qui nécessitent d'admettre une variabilité de la «virulence» des *Pédiocoques* de bière; du moins en est-il ainsi après la découverte d'espèces différentes dans ce groupe de microbes.

En fait de liquides nourriciers, j'ai employé encore du moût houblonné (marquant respectivement 13,5 ‰ Balling et 7 ‰ Ball.), du moût non houblonné (12 ‰ Ball.), de l'eau de levure légèrement acide, du bouillon de boeuf additionné de peptone, et de la décoction de foin. Par occasion, j'ai aussi essayé des décoctions de fumier de cheval. Les *Pédiocoques* évoluent plus ou moins vigoureusement dans tous ces milieux. C'est le moût houblonné qui est à préférer, ce milieu étant celui qui se trouve en brasserie à côté de la bière. Pourtant, dans des buts particuliers, soit lorsqu'il s'agit de déterminer la faculté d'acidification ou bien de décider si telle culture est encore en vie, il vaudra mieux employer le moût non houblonné, parce que la croissance dans ce dernier a lieu le plus rapidement. En effet, un moût non houblonné, infecté de jeunes cultures de *Pediococcus perniciosus* et de *Pediococcus damnosus*, a manifesté des signes de développement au bout de respectivement 3 et 5 jours, alors que pour le moût houblonné il s'écoulait, toutes conditions égales d'ailleurs, respectivement 5 et 7 jours. Règle générale, le *Pediococcus perniciosus* se développe un peu plus vite que le *Pediococcus damnosus*.

Les *Pédiocoques* de la bière produisent des acides dans les liquides nutritifs renfermant des hydrates de carbone. Dans 10 cc. de moût non houblonné (12 ‰ Ball.) le *Pediococcus perniciosus* a produit comme maximum une quantité d'acide correspondant à 6^{cc},4, de lessive de soude normale au dixième, tandis que le

Pediococcus damnosus n'en donne qu'une quantité correspondant à 4^{cc},8 de lessive de soude normale au dixième.

On peut neutraliser l'acide à mesure qu'il se forme, en plaçant au fond du flacon une couche de carbonate de chaux précipité. Alors dans les cultures de *Pediococcus damnosus*, le liquide qui se trouve en dessus, se maintiendra limpide tant qu'il y reste encore de la chaux non dissoute, tandis qu'il est, comme à l'ordinaire, terni par le *Pediococcus perniciosus*. Il est toutefois à remarquer que l'une et l'autre espèce se développent sensiblement moins facilement dans le moût non houblonné neutralisé par le carbonate de chaux qu'elles ne le font dans le moût non houblonné ordinaire. Parfois, et assez souvent, le développement n'a pas du tout lieu. Le mieux est de stériliser le carbonate de chaux à part sous l'eau, d'en ajouter ensuite, avec les précautions nécessaires, une quantité au moût stérilisé, et d'abandonner celui-ci à lui-même jusqu'à ce que la chaux se soit précipitée, avant de l'infecter.

Quant à la façon dont les Pédiocoques de bière se comportent vis-à-vis des liquides nutritifs alcalins, les résultats auxquels je suis arrivé sont en contradiction directe avec les opinions dominantes, suivant lesquelles ce ne serait ni le moût ni la bière, mais au contraire l'eau de levure ammoniacale qu'on devrait préférer comme milieu nutritif pour les analyses relatives aux microbes en question.

En dépit d'une multitude d'expériences, je n'ai jamais pu amener aucune de mes espèces provoquant de la maladie dans la bière et cultivées à l'état de pureté à se développer dans des liquides à réaction alcaline, et il m'a été autant impossible d'y obtenir un développement de Pédiocoques par inoculation directe de bière atteinte de la «maladie de Sarcine». J'ai cherché à réaliser les meilleures conditions possible pour la croissance des Pédiocoques en variant l'alcalinité des liquides nutritifs, laquelle a du reste été minime dans tous les cas; de plus, en variant la température, la tension de l'oxygène et le mode de culture préalable des matériaux d'infection, — le tout avec un résultat négatif. Entre mes séries d'essais, j'en citerai une seule, qui présente un intérêt tout particulier:

Du moût non houblonné, de l'eau de levure et du bouillon additionné de peptone furent sursaturés d'ammoniaque et stérilisés dans des flacons Freudenreich. Après la stérilisation, les trois

liquides montraient une réaction alcaline faible, mais pourtant bien prononcée. Alors ils ont été infectés de *Pédiocoques* développés dans divers liquides nutritifs. Un certain nombre des flacons infectés, abandonnés à l'action de l'air, n'ont montré au bout de 5 semaines aucun développement de microorganismes. Une autre série de flacons ont été placés sous une cloche, qu'on vida d'air jusqu'à une pression de mercure de 100 mm., et qu'ensuite on remplit d'acide carbonique jusqu'à rétablissement de la pression atmosphérique. Au bout de 12 jours, on constata un développement dans ces flacons; mais en même temps la réaction, d'alcaline qu'elle était, était devenue neutre pour l'eau de levure et pour le bouillon additionné de peptone, nettement acide pour le moût non houblonné. Pour s'expliquer cet état de choses, on pourrait se figurer que les *Pédiocoques* de bière croissent réellement dans des liquides alcalins, pour peu que la tension de l'oxygène soit suffisamment faible, et que durant la croissance ils forment un acide qui neutralise l'alcali. Cependant, cette possibilité se trouve exclue par le fait que dans une troisième série de flacons, dans lesquels pour raréfier l'oxygène on a employé de l'hydrogène au lieu de l'acide carbonique, il ne s'est produit aucun développement. C'est donc l'acide carbonique qui dans l'expérience ci-dessus décrite a neutralisé l'alcali, et c'est seulement alors que la croissance des *Pédiocoques* de bière est devenue possible. Il va de soi qu'une pareille possibilité se produit aussi quand on ajoute à des liquides nutritifs légèrement alcalins une quantité telle des matériaux d'infection ordinairement assez acides (par ex. de la bière »infectée de Sarcine«) qu'après cette addition le mélange n'ait plus de réaction alcaline. Lorsque dans les cultures effectuées par piqure dans des gélatines nourricières alcalines ou par épanchement à leur surface, on observe que les *Pédiocoques* de bière croissent extrêmement peu et pour peu de temps, il faut probablement de même l'expliquer en admettant que l'alcali a été neutralisé sur tel point et momentanément par les matériaux acides d'infection.

Une tension d'oxygène inférieure à celle de l'atmosphère est, règle générale, la plus favorable à la croissance des *Pédiocoques* de bière. Cependant tout dépend tant de la nature du milieu nutritif que de la température. En vue d'examiner de plus près cette question, j'ai infecté, dans des flacons Freudenberg, divers liquides nutritifs, puis je les ai placés

sous une cloche, où j'ai fait un vide partiel et introduit ensuite de l'acide carbonique ou de l'hydrogène. J'ai fait une comparaison de ces flacons avec des flacons parallèles abandonnés à l'action de l'air atmosphérique à la même température, et constaté qu'à des températures comprises entre 18° et 25° les deux espèces de *Pediococcus* se sont développées dans le moût (houblonné ou non houblonné) au moins aussi vigoureusement quand les flacons étaient exposés à l'air que lorsque la tension d'oxygène avait été diminuée. Aux températures basses, bien que le développement soit lent dans tous les cas, il est sensiblement plus actif quand la tension est réduite que si elle est normale.

Pour éclaircir cet état de choses, je vais citer une expérience sur le *Pediococcus damnosus* dans du moût non houblonné. Les chiffres indiquent l'augmentation d'acide dans 10 cc. de moût non houblonné, exprimée en cc. de lessive de soude normale au dixième.

Pediococcus damnosus. Augmentation d'acide dans 10 cc. de moût non houblonné.

Age de la culture en jours	Air atmosphérique		Air atmosph. (100 mm.) + CO ₂ (660 mm.)	
	25 °	5 à 7 °	25 °	5 à 7 °
14	2,6	0,1.	2,9	0,7
21	3,1	0,1	2,9	0,7
28	3,1	—	3,1	—
37	3,2	0,4	3,0	1,8

Pour les cultures dans du bouillon additionné de peptone et notamment dans de l'eau de levure, la diminution de la tension de l'oxygène s'est trouvée favoriser à toutes les températures le développement.

Même si l'oxygène est exclu aussi complètement que possible (par ex. par stérilisation des liquides, refroidissement avec insufflation d'acide carbonique pur, rapide infection, puis introduction continuelle de cet acide), les *Pédiocoques* de bière arrivent à évoluer. D'autre part, une tension considérablement plus élevée que la tension normale, m'a donné un développement dans le moût, mais non dans le bouillon additionné de peptone, ni dans l'eau de levure.

La température la plus favorable à la croissance des *Pé-*

coques de bière semble être comprise entre 23° et 24° . Mais si l'on veut prolonger ces cultures, il est préférable de travailler à des températures plus basses, soit à la température ordinaire de la chambre. En effet, les cultures s'affaiblissent très sensiblement avec l'âge, et cet affaiblissement est plus marqué encore à des températures plus élevées. L'exemple suivant pourra servir à élucider cet état de choses.

Une culture de *Pediococcus damnosus*, âgée d'environ 3 semaines, dans du moût non houblonné, fut transportée dans du moût houblonné, où elle donna un développement manifeste au bout de 13 jours à une température de 25° , tandis qu'à 19° elle ne le donna qu'au bout de 17 jours. Ces cultures ayant atteint l'âge de 4 semaines, on a infecté par chacune d'elles deux nouveaux flacons au moût, l'un à 25° et l'autre à 19° . Les cultures en 2^e génération seront désignées, d'une manière aisée à comprendre, comme suit: (25,25), (25,19), (19,25) et (19,19). Pour qu'un développement nettement prononcé se déclarât dans (25,25), il fallut 10 jours, pour (25,19) 26 jours, pour (19,25) 6 jours, et pour (19,19) 11 jours. On a infecté de même de nouveaux flacons au moût par les cultures en 2^e génération âgées de 3 semaines. Ceux-ci ont fait preuve de développement dans (25,25,25) au bout de 8 jours, dans (25,25,19) au bout de 18 jours; (19,19,25) a pris 5 jours, et (19,19,19) 7 jours.

On voit que la température la plus élevée donne toujours le développement le plus rapide, mais aussi, à un degré très sensible, le plus grand affaiblissement.

En somme, au bout d'un temps assez limité, les cultures de *Pédiocoques* de bière dans le moût ne sont plus capables de se développer, même quand on leur offre les conditions les plus favorables. C'est ainsi que dans le moût le *Pediococcus perniciosus* était déjà mort après environ 2 mois d'exposition à la température du laboratoire, alors que le *Pediococcus damnosus* a pu rester vivant dans des cultures en moût âgées de 3 mois, mais avait succombé dans une culture de 7 mois. Dans la bière pasteurisée, l'une et l'autre espèce restent en vie pendant 10 mois environ, le *Pediococcus damnosus* probablement encore plus longtemps.

Aucune des deux espèces ne liquéfie les gélatines nutritives. Elles s'y maintiennent en vie relativement longtemps. Ainsi, même après 5 mois d'exposition à la température de la chambre,

on a trouvé vivante une culture par piqûre dans du moût gélatinisé du *Pediococcus pernicius*, celle des deux espèces en question qui généralement résiste le moins.

Si l'on transporte dans de l'eau distillée et stérilisée quelques gouttes du dépôt produit, dans une bière pasteurisée, par les deux espèces de *Pediococcus* dont nous nous occupons, il se produit bien vite une formation caractéristique de zoogée. En secouant le dépôt, on constate qu'il est formé d'assez gros flocons détachés, et le microscope montre les *Pédiocoques* éparpillés au hasard dans un mucilage incolore dont on peut tout juste entrevoir les contours. Ce mucilage n'est attaqué ni par les alcalis ni par les acides, de même que ni l'iode ni les couleurs anilines ne le colorent. Contrairement à cette formation, qui s'est produite invariablement lorsque j'ai transporté dans l'eau des cultures faites dans la bière, je n'ai rien pu constater d'analogue pour les cultures faites dans d'autres milieux nutritifs.

Parmi les divers antiseptiques et moyens de lavage usités en brasserie, l'alcool (à 93 % et même à 50 %) et l'antiformine exercent sur nos *Pédiocoques* de bière une action sûrement fatale, même si l'on fait agir lesdits désinfectants pendant moins d'un quart d'heure. Le bisulfite semble donner des résultats pareils; toutefois, les recherches concernant l'action de cette substance n'ont pas été suffisamment poussées à bout pour permettre de donner des chiffres bien sûrs. L'acide tartrique à divers titres a été essayé sur le *Pediococcus damnosus*, et l'on a obtenu les résultats que voici: Une solution à 15 % exerce une action mortelle en 1 heure, mais non en $\frac{3}{4}$ heure. Pour une solution à 5 %, la limite de l'action qui tue à coup sûr se trouve entre 3 et 4 heures, et à 0,6 % la solution agit mortellement en 12 heures, mais non en 7 heures.

De ce qui précède, il ressort déjà qu'on a tant soit peu surfait l'action délétère qu'exercent sur les *Pédiocoques* de la bière les moyens de lavage contenant de l'acide fluorhydrique. Une solution à 1 % de fluorhydrate de fluorure d'ammonium, agissant pendant une heure, n'a tué ni *Pediococcus damnosus* ni *Pediococcus pernicius*, et il en est de même d'une solution à 2 % de montanine (solution aqueuse à 24 %, presque pure, d'acide fluosilicique).

S'agit-il d'estimer la valeur pratique des moyens de lavage pour l'industrie brassicole, il va sans dire qu'on doit tenir compte

non seulement de leur pouvoir de tuer les *Pédiocoques*, mais encore de leur faculté de dissoudre les sécrétions et enveloppements de diverse nature qui en maint cas seraient susceptibles d'empêcher une action efficace. Sous ce dernier rapport, c'est l'antiformine qui l'emporte de beaucoup sur tous ses analogues, alors que par ex. l'alcool, loin de dissoudre les sécrétions présentes, sera plutôt capable d'en causer de nouvelles.

IV. Récapitulation et Remarques finales.

Les plus importants des résultats qu'ont donnés les expériences décrites dans ce qui précède, peuvent se résumer dans les thèses suivantes:

1^o La maladie dite de Sarcine, qui affecte la bière, est causée par certaines espèces de *Pediococcus*. Les cultures absolument pures de celles-ci, issues d'une tétrade unique contrôlée au microscope, croissent sans difficulté dans le moût de bière et dans la bière pasteurisée.

2^o Pour séparer les *Pédiocoques* de la bière d'avec la levure ainsi que d'avec la plupart des autres microorganismes qui se trouvent dans la bière, on peut se servir de faibles solutions aqueuses de fluorhydrate de fluorure d'ammonium, auxquelles les *Pédiocoques* de bière résistent relativement bien.

3^o Il existe au moins deux espèces de *Pédiocoques* de bière, à savoir, d'une part, le *Pediococcus damnosus*, qui communique le plus souvent à la bière une odeur et un goût désagréables et qui ne forme qu'un dépôt insignifiant en soi, — et, d'autre part, le *Pediococcus perniciosus*, qui non seulement altère le goût et l'odeur de la bière, mais la trouble entièrement¹⁾.

4^o Une seule et même culture pure de *Pediococcus* provoque au cours de sa croissance dans une même bière toujours essentiellement les mêmes phénomènes morbides.

¹⁾ Le laboratoire de Carlsberg a fourni des cultures des deux espèces de *Pediococcus* au laboratoire de M. Král à Prague.

5^o Il est des sortes de bière dont telle est la nature que le *Pediococcus damnosus* peut y apparaître en abondance sans causer aucune maladie.

6^o Les Pédiocoques de bière croissent dans le moût houblonné ainsi que dans les autres liquides nutritifs acides ou neutres généralement en usage, tandis que l'alcali libre, même en quantité minime, empêche d'une manière radicale tout développement. L'eau de levure ammoniacale, dont on a tant préconisé l'emploi pour la constatation de la présence de Sarcines, est parfaitement impropre à servir pour les recherches en brasserie.

7^o Aux températures moyennes (15^o à 25^o), les Pédiocoques de bière, dans un liquide favorable comme le moût, sont assez indifférents vis-à-vis de l'oxygène, pouvant croître, d'une part, quand l'oxygène est complètement exclu et, d'autre part, lorsque la tension de l'oxygène dépasse de beaucoup celle de l'oxygène atmosphérique.

L'intérêt dont on entoure la question relative aux Pédiocoques, est dû sans doute avant tout aux dégâts que fait »la maladie de Sarcine« dans probablement tous les pays du monde où l'on fabrique de la bière. Mais, indépendamment de ce fait, la question qui nous a occupés présente un intérêt tout particulier pour le zymologiste, en ce sens qu'elle a occasionné assez d'incertitude et de tâtonnements relativement aux principes fondamentaux de l'analyse microbiologique de l'air et de l'eau des brasseries.

Le principe que Emil Chr. Hansen a formulé, et suivant lequel, dans les recherches microbiologiques à faire pour les brasseries, il faut se servir des liquides nutritifs mêmes dont le brasseur fait usage, — ce principe a été contesté par divers auteurs justement à cause du problème de »la maladie de Sarcines« (voir p. ex. P. Lindner, *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben*, 2te Aufl. 208 (1898).) On a affirmé, en effet, que la bière et le moût houblonné ne sont pas propres à servir de milieux

nourriciers pour les Pédiocoques de bière, et l'on a préconisé l'emploi d'eau de levure ammoniacale pour constater la présence desdits microbes. Or, les résultats obtenus dans les expériences que je viens de communiquer, font voir que ni l'une ni l'autre assertion ne sont soutenables. Dans mes expériences je me suis laissé guider par le principe précité de Hansen, de même que les méthodes indiquées par ce savant ont toujours formé la base de mes procédés. C'est conformément à ces méthodes que j'ai employé principalement, comme milieux nutritifs, le moût houblonné et la bière, milieux qui se sont trouvés on ne peut mieux appropriés à la culture et à la définition des Pédiocoques de la bière.

Il serait un peu hors de propos d'entamer ici une mention plus détaillée des diverses circonstances qui ont déterminé l'établissement des opinions opposées. Quant à une seule de celles-ci, savoir le fait que dans les analyses d'air et d'eau, avec du moût et de la bière comme milieux nourriciers, on n'a pu trouver de Pédiocoques de bière que par pure exception, j'espère pouvoir y revenir dans un travail ultérieur.

Juillet 1903.

UNE ESPÈCE NOUVELLE DE SACCHAROMYCES:
SACCH. SATURNUS KLÖCKER,
AYANT DES SPORES CARACTÉRISTIQUES

PAR
ALB. KLÖCKER

DANS le »Centralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten«, 2te Abt., VIII. 129 (1902), j'ai donné une communication provisoire et sommaire sur une espèce nouvelle de *Saccharomyces* dont les spores diffèrent notablement de celles de tous les autres *Saccharomyces* connus jusqu'ici. Cette espèce nouvelle se rattache aux levures qui se groupent autour du *Saccharomyces anomalous* Hansen. Seulement, tandis que les spores de cette dernière espèce sont en forme de chapeau avec un filet saillant partant de la base, celles de la levure découverte par moi sont ceintes, autour du centre, d'un filet saillant de sorte que par un faible grossissement elles rappellent les images communes de la planète de Saturne. C'est pourquoi j'ai donné à cette levure le nom de *Sacch. Saturnus*.

On sait que ce qui caractérise tout particulièrement le *Sacch. anomalous* et les espèces et races qui s'y rapprochent, est,

- 1^o La formation rapide de voile sur le liquide;
- 2^o Le filet saillant des spores, — et enfin
- 3^o La production d'éther.

Le *Sacch. Saturnus* développe tout d'abord sur le moût de bière un voile blanc et ridé, et en même temps il se forme de la levure de dépôt. Dans un voile jeune les cellules (voir fig. 1) sont de forme globulaire ou ovoïde. Leur taille varie de 4μ à 6μ environ. Si on laisse reposer une culture pendant quelque temps, les cellules s'agrandissent un peu; la plupart affectent la

forme sphérique et se remplissent de nombreuses gouttes de graisse (voir fig. 2). En même temps, le voile va grossissant, l'acide carbonique développé par la fermentation forme de grosses bulles, et la couleur devient plus jaunâtre. Dans une pareille culture en moût, laquelle avait séjourné pendant 1½ année à la température du laboratoire, les cellules avaient atteint une grandeur de jusqu'à $7\ \mu$; à côté de celles-ci, il s'en trouvait aussi de beaucoup moins grandes et de forme allongée.

Si l'on secoue la culture de manière à faire aller au fond une partie du voile, les vieilles cultures finissent par former un voile plus ou moins muqueux. Tel a été le cas par exemple pour des cultures en moût de bière dans des flacons Freudenreich et âgées d'un an environ. Dans ce voile muqueux il apparaissait de nombreuses cellules de grandeur démesurée, soit d'un diamètre d'environ $10\ \mu$ et plus; elles étaient vidées et avaient les parois épaisses (voir fig. 3). A côté d'elles, on pouvait observer quelques autres cellules moins grandes et renfermant des gouttes graisseuses.

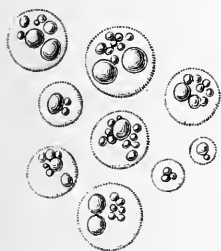


Fig. 2. Sacch. Saturnus. Cellules, renfermant des gouttes graisseuses, d'un voile d'env. 3 semaines sur du moût de bière. Température du laboratoire. Env. $1000/1$.

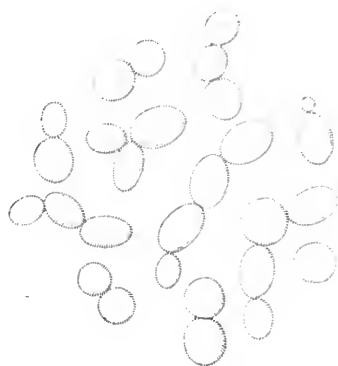


Fig. 1. Sacch. Saturnus. Cellules d'un voile formé depuis 24 heures, à 25° , sur du moût de bière. Env. $1000/1$.

Secouées, les cultures en moût de bière produisent aussi des ceintures de levure sur les parois du verre. Les cellules dont ces ceintures sont formées, ressemblent à celles des voiles d'un certain âge: elles sont principalement de forme sphérique, et beaucoup d'entre elles renferment des spores. Ici aussi, on a pu constater l'existence de cellules gigantesques, comme celles que je viens de mentionner.

La forme et l'apparence des cellules varient un peu selon le milieu nourricier, comme cela est le cas pour les Saccharomycètes en général.

Sur la bière de garde, le voile était formé principalement de petites cellules rondes d'un diamètre d'environ $3\ \mu$ à $4\ \mu$.

Sur l'eau de levure, il se forme rapidement un voile

recouvrant toute la surface et qui se compose de petites cellules rondes.

Sur l'eau de levure additionnée de saccharose (10 %): Dans le voile on observe des cellules rondes renfermant de nombreuses gouttes de graisse et qui ressemblent aux cellules des voiles d'un certain âge formés sur le moût. Diamètre: $6,6\mu$ et plus.

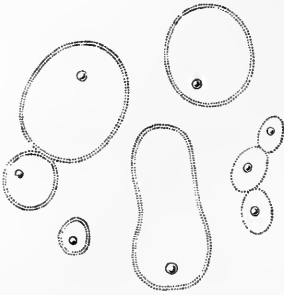


Fig. 3. Sacch. Saturnus. Cellules gigantesques d'un voile d'env. un an sur du moût de bière. A droite, trois cellules de taille normale. Temp. du laboratoire. Env. $1000/1$.

Sur l'eau de levure additionnée de maltose (7 %), le voile était formé de cellules rondes et ovoïdes, qui souvent avaient presque toutes formé des spores. La grandeur était, en moyenne, d'env. $4,6\mu$.

Sur l'eau de levure additionnée de dextrose (10 %) et sur l'eau de levure additionnée de lévulose (5 %), le voile se composait le plus souvent de cellules rondes, ovoïdes et oblongues, renfermant des gouttes d'huile. Sur ces milieux, les cellules forment généralement des colonies plus ou moins grandes (voir fig. 4), tandis que sur les liquides précédents elles sont le plus souvent isolées ou groupées deux par deux.

Sur l'eau de levure additionnée d'arabinose (5 %), les cellules du voile sont petites, ovoïdes ou rondes, vidées, sans gouttes de graisse.

Les cellules produites sur l'eau de levure additionnée de lactose, elles aussi, sont petites, ovoïdes ou rondes.

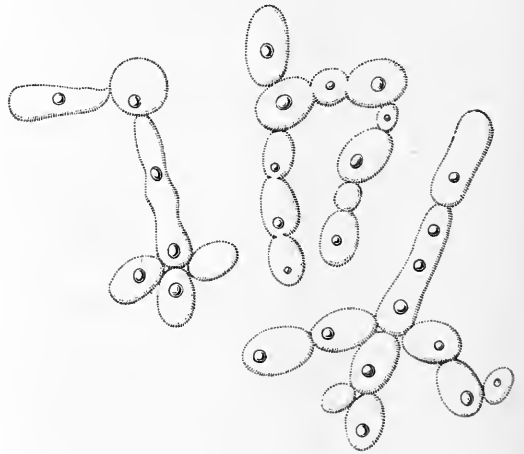


Fig. 4. Sacch. Saturnus. Cellules d'un voile de trois mois sur de l'eau de levure additionnée de dextrose. Temp. du laboratoire. Env. $1000/1$.

Sur le moût gélatinisé, le Sacch. Saturnus forme bientôt des colonies blanches ou d'un jaune pâle et dont la surface est sillonnée de rides; leur forme ressemble communément à celle d'un cratère. Les cellules de ces colonies sont généralement

de forme sphérique et renferment de nombreuses gouttes d'huile; grandeur de ces cellules: env. $6,6\mu$, parfois davantage. Peu à peu, la partie centrale de la colonie s'enfonce de plus en plus, parce que la gélatine se liquéfie lentement.

Par contre, sur la gélatine mélangée de bouillon additionné de peptone, les cellules sont petites et souvent un peu allongées. La croissance est très lente dans ce milieu. L'aspect de la colonie est essentiellement le même que sur le moût gélatinisé.

Les limites de température du bourgeonnement sur le moût de bière dans les flacons Freudenberg, se trouvent entre 2 à 4°C . et 35 à 37°C ., l'optimum se trouvant vers les 28° à 30°C . Pour les déterminer, j'aiensemencé, à des températures différentes, une trace d'une jeune végétation de voile sur la surface du moût de bière contenu dans un flacon Freudenberg.

La formes des spores est un peu variable. Elle rappelle le plus souvent celle d'un citron; mais quelquefois les pointes sont un peu recourbées et indistinctes. Les spores sont toujours ceintes, autour du centre, d'un filet saillant plus ou moins marqué¹⁾ (voir fig. 5). Dans leur intérieur se trouve un corpuscule globulaire fortement réfringent, vraisemblablement de nature adipeuse; car si l'on traite les spores par une solution d'hydrate de chloral (2 g. d'hydrate de chloral + 1 g. d'eau), le contour de ces corpuscules disparaît conformément avec les gouttes graisseuses des cellules ordinaires.

La longueur des spores, mesurée de pointe en pointe, est généralement d'env. 3μ ou un peu plus; la plus grande largeur est d'env. 2μ . On voit le plus souvent 2 spores dans une cellule, moins fréquemment 3, plus rarement 1, et le plus rarement 4. Je n'en ai jamais observé un plus grand nombre.

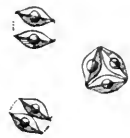


Fig. 5. Sacch. Saturnus. Cellules, pourvues de spores, d'un voile sur de l'eau de levure additionnée de maltose. Env. $1000/1$.

¹⁾ Dans ma communication provisoire, précitée, dans le »Centralbl.«, j'ai décrit la forme des spores comme »un globe aplati et ceint d'un filet saillant«. Tel est, en effet, généralement leur aspect dans les cultures sur blocs de plâtre, les pointes étant très minces et indistinctes. Mais dans mes recherches ultérieures je suis arrivé à reconnaître que la forme est plutôt celle d'un citron; c'est surtout dans les cultures produites sur l'eau de levure additionnée de maltose qu'elle se dessine le plus nettement.

Dans les cultures sur blocs de plâtre d'après la méthode Hansen, cette espèce produit en général facilement des spores. Les limites de température sont comprises entre 4 à 7° C. et 28 à 31½° C., l'optimum se trouvant vers les 25° C. A cette dernière température, les spores se produisent au bout de 43 heures environ.

Comme il se présentait des cas où le *Saccharomyces* nouveau donnait une sporulation plus abondante sur l'eau de levure additionnée de maltose que sur les blocs de plâtre, j'ai fait des essais de culture sur ce liquide, afin de déterminer dans ces conditions les limites de température, que je me figurais pouvoir être différentes de celles trouvées par la culture sur les blocs de plâtre. Il n'en fut pourtant rien: elles étaient identiques à celles indiquées ci-dessus.

Il ressort donc de ces expériences que la température minima de la sporulation est de quelques degrés plus élevée, et le maximum de quelques degrés plus bas que les températures correspondantes du bourgeonnement. Nous trouvons donc chez cette espèce aussi une confirmation de la loi découverte par Hansen pour l'évolution des organes de reproduction en question (*Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg*, II. 106 (1886), et V. 68 (1902)).

Sur d'autres milieux encore, il se forme des spores en abondance. Tel est l'eau de levure additionnée de maltose mentionnée plus haut et où, après quelque temps de repos, le voile est souvent formé presque exclusivement de cellules sporogènes. (Sur l'eau de levure additionnée de, respectivement, dextrose, lévulose, saccharose, arabinose et lactose, je n'ai jamais observé de spores dans le voile.) Sur le riz aussi, il se produit une abondance de spores. On en a trouvé également dans les ceintures de levure sur les parois du verre et dans les voiles des cultures en moût, ainsi que dans les végétations âgées et liquéfiées sur le moût gélatinisé.

Pour pouvoir déterminer et classer de telles cellules de levure, il est important de connaître la manière dont s'opère la germination des spores. Dans le cas présent la question serait de savoir si les spores de l'espèce nouvelle germent ou non de la même manière que celles des véritables *Saccharomyces*, savoir par bourgeonnement. Pour m'en rendre compte, j'ai pris pour point de départ un voile formé sur l'eau de levure addi-

tionnée de maltose, ce milieu étant celui qui pourrait me fournir le plus aisément des éléments d'ensemencement composés exclusivement de cellules sporogènes. Dans une chambre Ranvier fermée, renfermant du moût de bière étendu servant de liquide nutritif, voici comment la germination s'est faite à la température du laboratoire: Dans l'espace de 12 heures environ, la spore a perdu son brillant, le filet saillant a disparu, et les dimensions ont augmenté (fig. 6), la forme

devenant plus ou moins globoïde. Maintenant, la spore a présenté une certaine ressemblance à une cellule de levure à parois épaisses, apparemment sans autre contenu qu'un seul grain fortement resplendissant. Une seule

partie de la paroi était dans la plupart des cas plus épaisse et plus réfringente que le reste. Alors j'ai vu les spores germer par bourgeonnement de la même manière que

celles des *Saccharomyces* proprement dits. Dans plusieurs cas, j'ai observé deux spores qui s'étaient fusionnées (fig. 6, d), phénomène qui, d'après les recherches de Hansen, n'est point rare dans les *Saccharomycètes*.

En ce qui concerne l'action du *Sacch. Saturnus* sur les divers sucres, il se distingue bien nettement du *Sacch. anomalus* en possédant la faculté d'intervertir le saccharose, et de faire fermenter ensuite le sucre interverti. Il peut aussi faire fermenter le raffinose. Dans le moût de bière il provoque une fermentation lente, avec peu d'écume. Au bout de 46 jours, il ne s'était produit à 25° C. qu'environ 1% en volume d'alcool dans un ballon Pasteur de $\frac{1}{1}$ l. contenant du

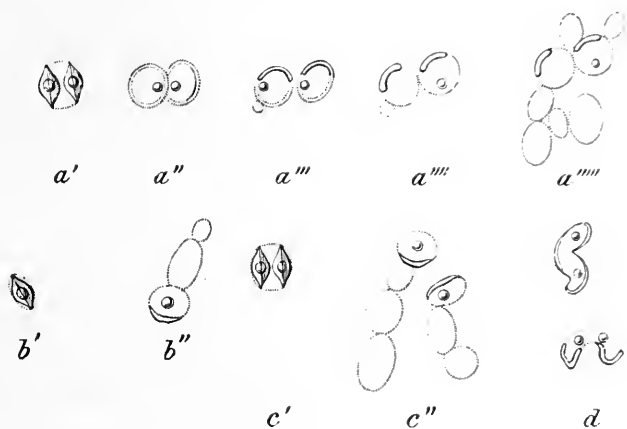


Fig. 6. *Sacch. Saturnus*. Des spores en germination dans du moût de bière étendu, dans une chambre Ranvier. a' une cellule renfermant 2 spores; a'' au bout de 13 $\frac{1}{2}$ heures, a''' au bout de 18 $\frac{1}{2}$ heures, a'''' au bout de 19 $\frac{1}{2}$ heures, a'''' au bout de 28 $\frac{1}{2}$ heures. b' une cellule à 1 spore; b'' au bout de 18 heures. c' une cellule à 2 spores; c'' au bout de 18 heures. d des spores fusionnées.

Env. $\frac{1000}{1}$.

moût houblonné ordinaire (d'une densité d'env. 14 ‰ Ball.) pour la bière de garde.

En même temps qu'il se produit de l'alcool, il se forme aussi de l'éther, qui se manifeste par une odeur fortement prononcée. En distillant le moût fermenté, on obtient un liquide qui sent fortement l'éther acétique. En ceci, mon espèce concorde donc avec le *Sacch. anomalus*, où W. Seifert a constaté la formation de cet éther. Les cultures en eau de levure additionnée de lévulose sentaient fortement l'éther de poires.

Si, pendant un long espace de temps, on laisse reposer une culture en moût couverte de son voile, l'alcool qui s'est produit disparaît. L'odeur d'éther disparaît aussi complètement, faisant place à une odeur aigrelette particulière. C'est ainsi qu'une culture en moût qui était exposée depuis 1½ année à la température du laboratoire, ne contenait plus d'alcool après examen fait au moyen de l'ébullioscope. Probablement l'alcool qui s'était formé avait été transformé par oxydation.

Pour ce qui concerne la durée de la vie de mon espèce, je n'en sais que peu de chose, attendu qu'elle n'est sujet de mes recherches que depuis deux années environ. Pendant toute cette période, elle s'est maintenue en vie dans une solution de saccharose et dans du moût de bière. Une végétation sur bloc de plâtre exposée pendant 8 mois à une température de 3 à 4 ° C. sans produire de spores, était encore en vie après ce laps de temps, et a formé par ensemencement dans du moût à 25 ° C., déjà au bout de 2 jours, un voile recouvrant toute la surface du liquide.

Le *Sacch. Saturnus* a été découvert pour la première fois dans des échantillons de terre pris dans l'Himalaya et que M. F. A. Möller, à Darjeeling, a eu l'obligeance de me faire parvenir. Plus tard, j'ai trouvé cette espèce, ou en tout cas un type qui s'y rapproche de très près (je n'ai pas eu l'occasion d'approfondir dans tous les détails l'examen des cultures ci-après), et dans de la terre danoise et dans de la terre italienne, de même que mon collègue M. Schiönning l'a rencontrée plusieurs fois dans des échantillons de terre de la même provenance.

Le Laboratoire de Carlsberg a fourni cette espèce au laboratoire de M. Král à Prague.

Ce qui précède peut se résumer dans la description suivante:

Sacch. Saturnus Klöcker.

Forme rapidement un voile blanc et ridé sur le moût de bière et sur d'autres liquides nutritifs sucrés.

Cellules rondes ou ovoïdes, rarement, mais quelquefois, oblongues; longueur ordinaire: 4 à 6 μ .

Limites de température du bourgeonnement sur le moût: 2 à 4 °C., et 35 à 37 °C.

Spores en forme plus ou moins régulière de citron, et ceintes d'un filet saillant autour du centre de pointe à pointe, longues d'env. 3 μ , renfermant un corpuscule globoïde et réfringent (de nature adipeuse?). Optimum de leur formation sur bloc de plâtre est voisin de 25 °C., le minimum est compris entre 4 et 7 °C., et le maximum entre 28 et 31½ °C.

Fait fermenter les dextrose, lévulose et raffinose, et intervient le saccharose pour faire fermenter ensuite le sucre interverti. En même temps que la fermentation, il y a formation d'un éther (éther acétique?). Ne fait pas fermenter les maltose, lactose et arabinose.

A été découvert dans de la terre prise dans l'Himalaya. La même espèce, ou en tout cas une espèce très voisine, a été observée dans de la terre danoise et de la terre italienne.

Août 1903.

SUR LA CLASSIFICATION DU GENRE PENICILLIUM, ET DESCRIPTION D'UNE ESPÈCE NOUVELLE FORMANT DES ASQUES

PAR

ALB. KLÖCKER.

ON sait que diverses espèces du genre de *Penicillium* se rencontrent très fréquemment dans la nature et aussi dans les différentes localités des brasseries. Dans celles-ci les céréales et le malt en sont attaqués et, de plus, elles apparaissent sur les foudres, parois etc., bref, partout où il y a de l'humidité, leurs exigences relatives à la nourriture étant des plus modestes. En outre, la bière mise en bouteilles peut prendre un goût et une odeur désagréables par suite de la présence de *Penicillium*, par ex. quand cette moisissure a infecté le bouchon. Pour le vin, il a été démontré par Wortmann que le goût particulier qu'il prend parfois dans certaines circonstances et qui est nommé en allemand »Stopfengeschmack«, est dû à des champignons appartenant à ce genre. Les espèces qui le constituent sont donc au nombre des organismes dont l'importance pour l'industrie zymotechnique est assez considérable. Elles ont aussi joué un certain rôle dans l'histoire des erreurs scientifiques, en ce sens qu'autrefois on a cru, à tort, trouver parmi elles les types primitifs de la levure.

Il n'y a que peu d'espèces de ce genre qu'on a bien caractérisées jusqu'ici; les descriptions données sur la plupart d'entre elles sont tellement défectueuses qu'on ne saurait les identifier. La position systématique du genre *Penicillium*, elle aussi, a été vivement débattue, et elle a été changée plus d'une fois. Dans

ce qui va suivre, je me propose aussi de fournir une contribution à la classification du genre *Penicillium*.

L'espèce qui a été décrite la première, est le *Penicillium crustaceum* L. (*P. glaucum* Link), dénomination qui cependant, comme on l'a reconnu plus tard, comprend plusieurs espèces. Ce qui caractérise toutes les espèces de *Penicillium*, c'est la formation de conidies, et pendant longtemps on n'a connu chez le *Penicillium* que cette reproduction végétative. C'est seulement en 1872 que Brefeld¹⁾ a constaté que le *Penicillium glaucum* est à même de produire une forme supérieure de fructification, à savoir les asques, découverte qui a classé ladite espèce dans les Ascomycètes. Ayant constaté en outre que cette formation d'asques est précédée d'une production de scléroties — vu que c'est dans l'intérieur de ceux-ci que les asques prennent naissance —, Brefeld a rangé le *Penicillium glaucum* parmi les Tubéracées, famille de champignons chez laquelle les asques se forment précisément dans l'intérieur de corps ressemblant aux scléroties. Cependant, ainsi que nous le verrons ci-dessous, on a plus tard découvert d'autres espèces de *Penicillium* où les scléroties font défaut, les asques se formant sans production préalable de scléroties. Plus tard, Brefeld n'a rien énoncé, que je sache, sur la classification de *Penicillium*; mais dans la »Vergleichende Morphologie der Pilze« publiée en 1892 par F. v. Tavel, ce genre est rapporté aux Périssporacées, famille que cet auteur met à côté des Tubéracées et Erysiphées comme coordonnées à celles-ci. Je suppose que c'est aussi l'opinion actuelle de Brefeld que v. Tavel, son disciple et collaborateur, exprime ainsi; car dans la préface de l'ouvrage cité il est dit que l'auteur se propose de donner un aperçu non seulement des recherches de Brefeld, mais encore de son jugement.

Cependant, certains des types rapportés au *Penicillium glaucum* d'après l'aspect de la végétation conidienne paraissent être incapables de produire la fructification supérieure dont il s'agit. Tel est p. ex. le cas des types trouvés ici en Danemark et examinés au Laboratoire de Carlsberg. Pas une seule fois nous n'avons pu parvenir à les amener à produire des asques, quoique ayant suivi de point en point le mode de culture indiqué par Brefeld. Le procédé recommandé par Zukal et que nous avons également essayé, savoir culture sur des écorces d'oranges

¹⁾ Brefeld, Entwicklungsgeschichte von *Penicillium* [Botan. Ztg., 1872].

douces ou de citrons, ne nous a pas donné de résultats positifs non plus.

Van Tieghem, en 1876, a fait la communication assez intéressante¹⁾ qu'il avait découvert une espèce nouvelle de *Penicillium*: *P. aureum*, qui produisait des asques sans formation préalable de scléroties. Au reste, van Tieghem est d'avis que la formation de scléroties ne peut pas, de soi, servir de marque distinctive prouvant une relation générique. Selon lui, elle est de nature plutôt physiologique que morphologique, car elle peut exister ou manquer, selon les conditions de croissance, chez des espèces d'un seul et même genre et, qui plus est, chez des individus d'une seule et même espèce. Nous y reviendrons plus bas. Ce qui est plus important en ce cas, c'est son observation de la formation d'asques chez le *Penicillium aureum* mentionné plus haut et dont, ainsi que nous l'avons vu, les asques se forment directement, sans formation préalable de scléroties. En même temps van Tieghem décrit une espèce nouvelle de *Gymnoascus*: *G. rubrum*, qui forme ses asques tout à fait de la même manière que le *Penicillium aureum*, de même qu'ils se ressemblent sous d'autres rapports aussi. La différence qui détermine le classement des deux espèces dans différents genres, se trouve uniquement dans la fructification conidienne. Aussi, dans son »*Traité de Botanique*«, il place les deux genres dans une seule et même tribu sous la famille des Périsporacées.

Zukal²⁾, en 1889, a décrit, sous le nom de *Penicillium luteum*, une troisième espèce qui forme des asques et dont, selon lui, on ne saurait contester le caractère de *Gymnoascus*. Il croit pouvoir affirmer que le genre de *Penicillium* doit être classé dans la famille de *Gymnoasci*.

De plus, une description de l'espèce mentionnée plus haut a été donnée par Wehmer³⁾ qui, abordant la question de sa classification, déclare qu'il préfère rapprocher le genre de *Peni-*

¹⁾ Van Tieghem, Sur le développement de quelques Ascomycètes (Bull. de la Soc. botan. de France, XXIV, 157 (1877)).

²⁾ H. Zukal, Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen aus dem Gebiete der Ascomyceten (Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. in Wien. Math.-Naturw. Cl. XCVIII, 561, (1889)).

³⁾ Wehmer, Morphologie und Entwicklungsgeschichte von *Penicillium luteum* Zuk., eines überall häufigen grünen Schimmelpilzes (Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 1893).

cillium des Erysiphées, Eurotiées et Tubéracées, plutôt que des Gymnoascées. Deux années plus tard, ce même savant¹⁾ décrit une espèce nouvelle: le *Penicillium italicum*, qui se distingue en formant des scléroties à l'instar du *P. glaucum*; mais, par opposition à cette dernière espèce, il ne se développe pas d'asques dans l'intérieur de ces scléroties: les scléroties restent simplement à l'état de scléroties.

Mentionnons enfin que dans la »Kryptogamen-Flora von Schlesien« de Cohn, III, Pilze, 220 (1893), Schröter indique un *Penicillium insigne* (Winter). Sous cette appellation il désigne l'*Eurotium insigne* distribué par Winter dans les »Fungi Europæi exsiccati«, Cent. XVIII., de Rabenhorst, et dont la fructification conidienne serait le *Gliocladium penicillioïdes* Corda. Wehmer²⁾ fait la même affirmation, tandis que Lindau³⁾ est d'avis que le *Gliocladium* n'a rien à faire avec le *Penicillium*. Edw. Fischer⁴⁾, outre les trois espèces de *Penicillium* formant des asques et mentionnées plus haut, cite aussi le *P. insigne* (Winter).

On verra donc par ce qui précède qu'après la découverte des ascospores il y a eu, et qu'il y a encore aujourd'hui, des opinions contraires sur la classification du *Penicillium*. C'est ce qui rend désirables des contributions nouvelles pouvant mener à la vraie conception.

Autant que je sais, on ne connaît jusqu'ici que quatre espèces, tout au plus, de *Penicillium* capables de former une fructification par asques, et une espèce qui forme des scléroties mais non des asques, tandis que toutes les autres n'ont que la fructification conidienne⁵⁾. Les quatre espèces qui forment

¹⁾ Wehmer, Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze. II. 68. (1895). L'année précédente, W. avait donné dans le »Hedwigia« une description sommaire de cette espèce.

²⁾ Hedwigia, XXXIII. (1894).

³⁾ Engler & Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, I, 1ste Abt. ** (1900).

⁴⁾ *ibid.* I., 1ste Abt. (1896).

⁵⁾ Lindau (à l'endroit cité) dit que le nombre total des espèces décrites jusqu'ici de ce genre se monte à 46. Dans son »Essai de revision du genre *Penicillium* Link« (Ann. de la Soc. scientif. de Bruxelles, XXV. (1901)), Fr. Dierckx décrit 25 espèces de *Penicillium*. Entre celles-ci il n'y a que 3 des espèces connues auparavant. Chez aucune d'elles il ne parle d'une fructification par asques; toutes ses descriptions ne sont basées que sur la

des asques peuvent facilement être distinguées les unes des autres. Ainsi que nous l'avons vu, le *P. glaucum*, par opposition aux trois autres, forme d'abord des scléroties. Les ascospores du *P. luteum* sont munies de filets saillants et transversaux; chez le *P. aureum* les ascospores sont lisses, tandis que chez le *P. insigne* elles sont hérissées de piquants courts et émoussés; chez cette dernière espèce elles sont aussi très grandes (larges de 16 à 20 μ). Or, je suis parvenu à découvrir une cinquième espèce formant des asques et qui a l'aspect d'un *Gymnoascus*, surtout du *Gymnoascus flavus*¹⁾, abstraction faite de la fructification par conidies, qui est la même que chez un *Penicillium* type, et je peux essentiellement confirmer les affirmations de van Tieghem et de Zukal relatives à la place du genre *Penicillium* dans le système, pour ce qui concerne les espèces qui développent des asques sans formation préalable de scléroties: Leur place naturelle se trouve dans la famille des *Gymnoascées*, à côté du genre *Gymnoascus*.

Nous arrivons maintenant à la question de savoir où il faut classer les autres espèces rapportées jusqu'ici au genre *Penicillium*. La marque commune à toutes les espèces, c'est l'appareil conidien; mais ce caractère, à lui seul, ne peut être considéré comme suffisant pour réunir les espèces sous un même genre, quand la fructification supérieure: la formation d'asques, est aussi différente qu'elle l'est dans le cas présent. En effet, c'est la fructification supérieure à laquelle les classificateurs s'en tiennent de préférence. Tant que du *Penicillium glaucum* on ne pourra pas trouver aussi des individus capables de produire des asques sans formation préalable de scléroties, il faut admettre qu'ici

couleur des végétations et sur diverses dimensions mesurées. On peut en dire autant du »Prodrome d'une flore mycologique obtenue par la culture sur gélatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud, près de Bussum« (Archives néerlandaises des Sciences exactes et naturelles, Série 2, VII. (1901)) de C. A. J. A. Oudemans & C. J. Koning. Ici, 4 espèces nouvelles sont décrites et figurées: mais les descriptions sont très sommaires, et d'une fructification par asques il n'est rien dit. Conséquemment, il est impossible de dire si parmi tous ces types de *Penicillium* il se trouve des espèces formant des ascospores. On n'y parle non plus d'essais de culture à cet égard.

¹⁾ Alb. Klöcker, *Gymnoascus flavus* n. sp. (*Hedwigia*, XLI. 80. (1902), et *Botanisk Tidsskrift*, XXV. 49. (1902)).

le développement de scléroties est absolument nécessaire; nous ne pouvons, à l'instar de van Tieghem, nous en consoler en pensant que chez certains genres de champignons ce développement peut, dans les individus d'une même espèce, tantôt faire défaut, tantôt se produire; il est impossible d'en faire abstraction; la conséquence en serait qu'alors on ne pourrait pas attribuer à la formation d'asques non plus aucune importance pour la classification, attendu qu'elle a précisément une grande tendance à faire défaut.

Le *Penicillium glaucum* doit donc jusqu'à nouvel ordre constituer un genre à part qui, conformément à l'opinion de Brefeld et v. Tavel, doit se ranger sous les Périssporacées et à côté des Erysiphées et Tubéracées. Par contre, les autres espèces à formation d'asques et sans développement de scléroties doivent, comme nous l'avons vu, être rapportées aux Gymnoascées. Enfin, quant à toutes les autres, au sujet desquelles nous ne savons pas si elles forment ou non des asques, il faut provisoirement les compter parmi les »Champignons imparfaits« (*Fungi imperfecti*), jusqu'à ce qu'on ait découvert une fructification supérieure. Il va de soi que la même règle s'applique aux types qui ne produisent que des scléroties sans donner d'asques.

L'état actuel des choses ne m'invite pas à introduire de nouveaux noms génériques. Dans le cas où de nouvelles recherches feront voir que la classification que je viens d'indiquer se vérifie dans son ensemble, ce qu'il y aura de plus naturel sera de garder le nom générique de *Penicillium* pour les espèces classées parmi les *Fungi imperfecti*. Il faudrait alors donner à l'espèce traitée par Brefeld: *P. glaucum*, un nouveau nom générique, tandis que les espèces qui développent des asques sans formation préalable de scléroties et que, à l'exemple de Zukal, je compte parmi les Gymnoascées, devront ou constituer un nouveau genre appartenant à cette famille, à côté du *Gymnoascus*, ou bien simplement être admises dans ce genre. Je garderai pourtant provisoirement le nom de *Penicillium* pour l'espèce nouvelle découverte par moi et qui va être décrite.

Le professeur et docteur Wortmann de Geisenheim sur-le-Rhin, dont les travaux de microbiologie et de fermentation du vin sont si célèbres, a englobé dans ses études, comme on l'a déjà dit, le traitement des rapports du *Penicillium* au vin.

D'après lui, je désignerai cette nouvelle espèce sous le nom de *Penicillium Wortmanni*.

Je l'ai déjà plusieurs fois trouvée dans des échantillons de terre pris soit en Danemark, soit en Italie, soit dans l'Himalaya. J'en ai trouvé trois ou quatre variétés qui dans certains sens se comportent un peu différemment, par ex. en ce qui concerne le rapport de la formation de conidies à celle des asques; mais dans l'ensemble il y a concordance entre elles.

Ces variétés ont toutes été trouvées dans d'épaisses couches de diverses moisissures, qui se formaient quand des matras renfermant un mélange de terre et de moût de bière ont séjourné assez longtemps. Alors on y a vu des végétations de mycelium jaune mêlé de corpuscules arrondis, feutrés, qui sont les amas d'asques. En général, il n'y a eu en même temps aucune formation de conidies, ou bien elle a été très faible, et la première fois que j'ai rencontré cette espèce, je l'ai prise immédiatement pour le *Gymnoascus flavus* précédemment décrit par moi, ou une espèce voisine. Cependant, en l'isolant et la cultivant à l'état de pureté dans des conditions diverses, je suis parvenu à susciter à volonté soit une végétation riche en conidies, soit une végétation presque exclusivement composée de mycelium et d'asques. La première se produit sur d'épaisses couches de moût gélatinisé, l'autre, par ex., par ensemencement dans des flacons Freudreich renfermant de minces couches de moût étendu. J'ai, en outre, semé les ascospores dans une chambre humide et étudié leur développement jusqu'à formation de conidies. Autant à l'oeil nu qu'au microscope, on trouve à une végétation exclusivement composée d'asques et de mycelium exactement le même aspect qu'à certaines espèces de *Gymnoascus*. Les amas d'asques sont entourés d'un tissu lâche d'hyphes tout à fait analogue à celui qu'on rencontre chez les *Gymnoascus*, et les ascospores ont exactement la même apparence que celles du *G. flavus*. L'unique différence qui reste, est donc que le *P. Wortmanni* a la végétation conidienne typique qui est propre au *Penicillium* mais absente chez le *G. flavus*. Dans le cas de cette dernière espèce on voit simplement apparaître de temps en temps, au sein même du liquide qui sert de milieu de culture, des conidies un peu oblongues et limpides comme l'eau, et ces conidies sont disposées en chapelets, partant de branches courtes, qui ont de

l'analogie avec un stérigme¹⁾. D'après Wehmer, les asques n'apparaissent pas régulièrement chez le *P. luteum*. Je peux pleinement confirmer ce résultat. En effet, soit en employant les matériaux fournis dans le temps à notre laboratoire par M. Zukal, soit en me servant d'une culture due à M. Wehmer (et qui nous avait été envoyée par le laboratoire de M. Král de Prague), je n'ai jamais pu obtenir un développement d'asques dans cette espèce, ni même dans les conditions où ces organes se produisent facilement chez le *P. Wortmanni*. Chez cette dernière espèce, en effet, il en est tout autrement. Quand on en sème, soit des conidies, soit des ascospores, dans un flacon Freudenberg renfermant une mince couche (soit six gouttes) de moût de bière étendu, et qu'on abandonne cette culture à un repos quelque peu prolongé (6 jours ou plus), il se produit une végétation jaune ou rougeâtre et qui se compose presque exclusivement de mycelium et d'amas d'asques. Une pareille végétation se produit aussi par ensemencement dans une solution de saccharose à 10 %, bien qu'ici elle soit de beaucoup moins développée. Par contre, si l'on veut obtenir une abondante végétation de conidies, sa meilleure production a lieu sur une épaisse couche de moût gélatinisé. Il se forme ici une couche irrégulière d'une végétation mycélienne avec de fortes dépressions; ordinairement, la partie centrale a une couleur verdâtre due à la formation de conidies, et cette partie est entourée d'une ceinture jaune. Souvent aussi, les appareils conidiens sont réunis en ceintures: c'est ce qu'on constate généralement par ex. quand l'ensemencement se fait sous forme d'une culture par dissémination sur du moût gélatinisé renfermé dans des boîtes Petri. On voit alors que, règle générale, le centre des végétations est jaune; puis vient une bande gris verdâtre formée par les appareils conidiens et entourée, à son tour, d'une ceinture de mycelium jaune. La couleur jaune passe souvent à une

¹⁾ Voir la fig. 4 de mon mémoire précité sur le *Gymnoascus flavus*.

Chez cette espèce, la formation de conidies rappelle la production anormale de conidies qu'on peut rencontrer assez souvent chez certains types de *Penicillium*. Il n'est pas invraisemblable que le *G. flavus* ait eu originairement une végétation typique de conidies (en sorte qu'il aurait été ce que nous appelons *Penicillium*), et qu'il l'ait perdu avec le temps. Par conséquent, tel qu'il est maintenant, il ne saurait être classé nulle part ailleurs que dans le genre *Gymnoascus*.

teinte rougeâtre atteignant l'orangée. Si, pour l'ensemencement d'une pareille culture par dissémination, l'on prend des éléments copieux, de façon que les taches se soudent bientôt en croissant, la masse mycélienne tout entière garde ordinairement sa couleur jaune ou orangée, parce qu'alors la production de conidies est très peu abondante. Sous ce rapport, les variétés examinées par moi

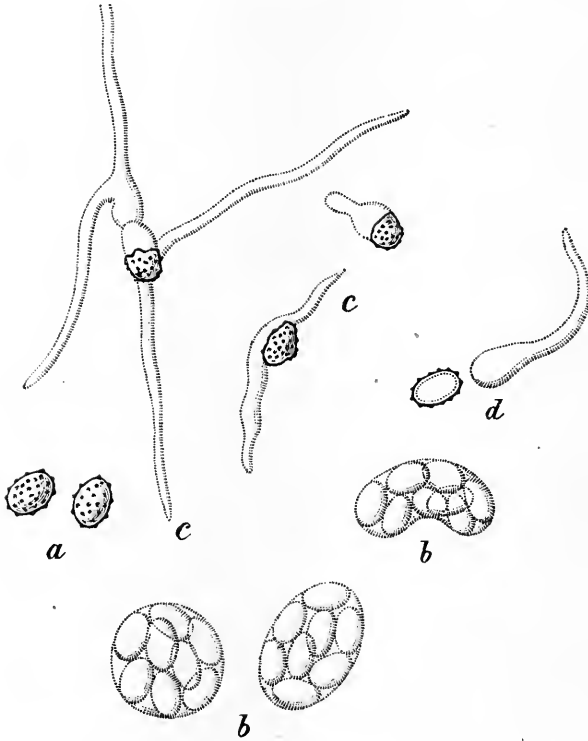


Fig. 1. *Penicillium Wortmanni*, nova species.
a, ascospores. b, asques renfermant de jeunes ascospores. c, d, ascospores en germination. c montre une partie de l'exosporium laquelle, après la germination, entoure l'endosporium. d, l'exosporium entier détaché. Env. $\frac{1000}{1}$.

se comportent différemment; car, dans les conditions en question, quelques-unes d'elles produisent très facilement des conidies, et alors la végétation entière prend une couleur gris verdâtre. En général, la couleur est très variable. — Sur moût gélatinisé, surtout en couche mince, il y a souvent aussi formation d'asques.

Du reste, pour caractériser l'espèce qui m'occupe, je peux ajouter ceci:

Le mycelium, d'abord blanc, prend bientôt une couleur jaune-soufre, qui parfois passe ensuite à l'orangé.

La surface des filaments mycéliens est souvent munie de grains jaunes, dont la matière colorante est facilement soluble dans l'alcool.

Les appareils conidiens varient de grandeur selon les milieux nourriciers; les stérigmes sont ordinairement longs de 9 à 13 μ .

Les conidies sont ovoïdes ou rondes, le plus fréquemment longues d'env. 2 μ ; mais on en rencontre aussi beaucoup de plus grandes, gonflées. L'entière masse conidienne est de couleur gris verdâtre, plus tard d'un beau gris clair.

Elles germent après gonflement, en émettant un ou plusieurs tubes germinatifs.

Les amas d'asques sont jaunes ou rougeâtres et entourés d'un tissu d'hyphes peu cohérentes.

Les asques sont ronds, ovoïdes ou, plus rarement, réniformes (fig. 1 b); parfois, leur forme est très irrégulière. Leur plus long diamètre est de 8 à 13 μ (le plus fréquemment de 10 μ env.). Ils renferment 8 ascospores ovoïdes, longues d'env. 4,6 μ sur env. 2,6 μ de largeur. La surface des spores présente de petites verrues plus ou moins distinctes (fig. 1, a). Les ascospores sont souvent teintées en jaune par une substance colorante soluble dans l'alcool.

Les ascospores (en tout cas les anciennes) affectent ce mode de germination que l'exosporium éclate et que l'endosporium, avec son contenu, développe un ou plusieurs tubes germinatifs. On voit souvent, après germination, l'exosporium éclaté entourer partiellement l'endosporium (fig. 1, c). C'est seulement par exception que l'exosporium tout entier se renverse et reste aux côtés de la spore germée; alors on n'y voit aucune ouverture (fig. 1, d), de même que je l'ai aussi observé dans la germination des spores chez le *Gymnoascus flavus* (voir l'endroit cité); d'après Wehmer, il en est toujours ainsi du *P. luteum*.

En croissant sur moût gélatinisé, le *Penicillium Wortmanni* liquéfie ce milieu.

Le nouveau *Penicillium* se rapproche à plusieurs égards du *P. luteum*. Il s'en distingue d'abord par ses ascospores, dont la surface est pleine de verrues, tandis que chez le *P. luteum* elles sont munies de 3 ou 4 filets transversaux. De plus, les végétations du *P. Wortmanni* sur une épaisse couche de moût gélatinisé affectent des formes très irrégulières, et sont fortement plissées, surtout fortement déprimées au centre, tandis que chez le *P. luteum* elles sont circulaires et présentent une surface tout à fait égale, sur laquelle il apparaît bientôt des gouttes brunes de moût gélatinisé liquide, phénomène que j'ai constamment observé chez cette espèce, mais jamais chez le *P. Wortmanni*. En ensemençant cette dernière espèce sur une mince couche de moût de bière étendu, renfermée dans des flacons Freudenreich, il se produit une végétation jaune de mycelium et d'asques; par contre, le *P. luteum* ne donne pas

d'asques dans ces conditions, mais des végétations de conidies vertes çà et là dans le mycelium jaune.

Il ressort donc de ce qui précède que le *P. Wortmanni*¹⁾ est une espèce bien définie et qui présente un certain intérêt non seulement en raison de son extraordinaire aptitude à donner des ascospores, mais encore par le service qu'il rend en mettant à même d'assigner aux espèces classées jusqu'ici sous le nom générique de *Penicillium*, les places qu'elles doivent occuper dans le système.

Août 1903.

¹⁾ Notre laboratoire a fourni une culture de cette espèce à celui de M. Král de Prague.

NOUVEAU GENRE DE LA FAMILLE DES SACCHAROMYCÈTES.

PAR

H. SCHIÖNNING

DURANT le printemps de 1902, M. le professeur E. Chr. Hansen, ayant pris un échantillon de terre à un talus gazonné entre le Hospenthal et le défilé du Saint-Gothard, l'envoya à notre laboratoire de Carlsberg pour le faire analyser. J'y trouvai une levure nouvelle, où des recherches plus amples firent constater des caractères qui l'excluent du genre *Saccharomyces*, mais lui font reconnaître le titre de représentant d'un nouveau genre en dedans de la famille des *Saccharomycètes*. Ce nouveau genre a reçu de moi la dénomination de *Saccharomycopsis*, et à la nouvelle espèce décrite plus loin, j'ai donné le nom de *Saccharomycopsis capsularis*. Je reviendrai plus tard sur ce point pour mieux motiver le choix de cette dénomination.

En analysant le susdit échantillon de terre, on a fait une culture par dissémination dans du moût gélatinisé, afin de mieux séparer les uns des autres les différents organismes présents. Parmi les colonies qui se développèrent, quelques-unes se sont attiré l'attention par leur singulière apparence; car celles qui dépassaient la surface de la gélatine, avaient l'air légèrement velues. Le microscope révéla dans cette colonie un mélange de mycelium et de cellules de levure. On prit pour point de départ une de ces colonies pour cultiver par cellule unique en chambre humide sur moût gélatinisé d'après la méthode de culture pure indiquée par Hansen. En transportant sur du moût de bière cette culture pure, on vit bientôt ce moût fermenter, et la végétation de levure de dépôt qui venait de se former ainsi, servit à une culture ordinaire sur bloc de plâtre, d'où l'on eut quelques spores. L'ensemble de sa manière caractéristique

de croître sur moût et la structure non moins remarquable de ses spores, me rendirent aussitôt évident que j'avais trouvé là un champignon de levure digne d'attention et jusqu'ici inobservé: j'en poursuivis donc l'étude plus minutieuse, et ce qui suit mentionnera le résultat de ces recherches.

Concurremment à la culture pure susdite tirée d'une seule cellule végétative, j'employai une culture provenant d'une spore unique; les résultats furent les mêmes. Si l'on introduit une telle culture pure dans un matras avec du moût et l'expose à une température favorable, par exemple 25 ° C., elle se déve-

loppe rapidement. En un jour il se forme un dépôt de levure dans le matras, et le moût entre peu à peu en fermentation. En examinant au microscope cette levure de dépôt, on la trouve composée d'une végétation de levure typique de cellules bourgeonnantes, qui diffèrent de formes et de grandeur. On en voit d'ellipsoïdes et d'ovoïdes; on voit aussi des cellules rappelant les *Saccharomyces Pastorianus*, et l'on

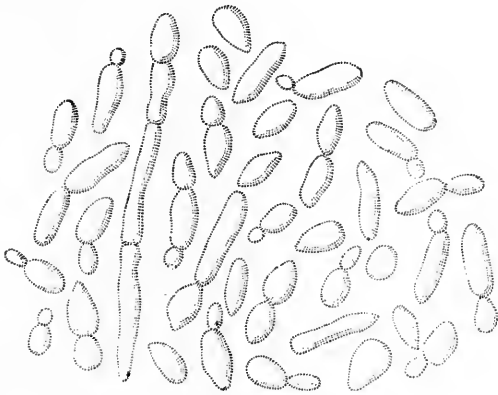


Fig. 1.

Végétation de levure de dépôt en moût de bière, au bout de 1 jour à une température de 25 ° C. ^{500/1}.

pourrait presque y voir une levure appartenant à ce groupe. Nombre d'entre elles sont un peu en pointe, soit en un bout, soit des deux, comme le montre fig. 1 ¹⁾. On trouve aussi, mais rarement, des cellules allongées et cloisonnées. Dans le cours de la deuxième journée, il commence à se former à la surface du moût de petits voiles formant îlots. L'examen microscopique de ce voile lui fait trouver un aspect tout autre qu'à la levure de dépôt; car elle se compose soit d'un mycelium typique à ramification et cloisons; soit d'un mycelium qui développe des bourgeons; ou encore d'un mycelium qui se scinde suivant les cloisons et s'arrondit en articles ronds ou bien analogues à l'*Oïdium*; ou enfin l'on voit de longues fils de cellules de levure bour-

¹⁾ Les figures ont été dessinées d'après des photographies faites au moyen de l'appareil microphotographique Zeiss du laboratoire de Carlsberg.

geonnantes. La levure de dépôt peut aussi au bout de 2 jours présenter quelques formations mycéliennes et de longues cellules avec des cloisons; du reste, son aspect au microscope est essentiellement le même qu'au bout du premier jour. Si le repos se prolonge, un voile se formera et couvrira toute la surface du moût, fréquemment étendu sur de grosses bulles d'écume qui rendent le voile fortement inégal. Si la culture est laissée com-

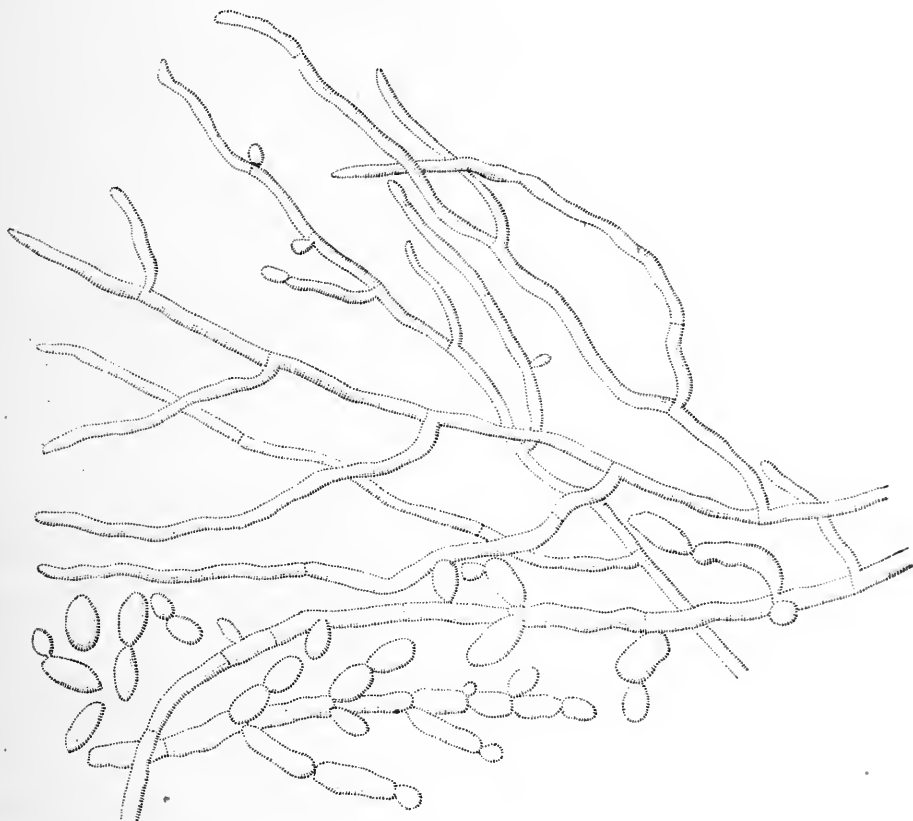


Fig. 2.

Végétation prise à un îlot de voile en moût au bout de 2 jours, à 25 ° C. $\frac{500}{1}$

plètement en repos, cette formation superficielle épaissit souvent avec le temps et forme à la surface un tapis épais, très inégal, sec et blanc, légèrement velouté, composé d'un mélange de mycelium et de cellules de levure. Ce mycelium peut aussi développer des cellules de levure et, de plus, il y a beaucoup de filaments de mycelium qui par étranglement donnent des articles plus indépendants. C'est surtout dans les cultures en flacons Freudenreich que la formation superficielle au repos peut acquérir une très grande épaisseur; ainsi au bout d'un mois et à la température

ordinaire du laboratoire, une culture en moût de bière dans un tel flacon donna une couche épaisse de 20 mm. Si le repos se prolonge encore, cette végétation superficielle donne quelques spores. On dira plus tard comment se forment ces spores.

Si l'on infecte de l'eau de levure ordinaire dans un flacon Freudenreich avec un peu d'un voile formé sur du moût et qu'une fois ou deux on rafraîchisse à l'aide du même liquide nutritif la végétation qui s'est développée, on constatera au bout d'un jour d'abandon à 25 ° C. l'évolution de colonies microscopiques de mycelium. Le microscope les présentera comme un ample développement de mycelium typique, ramifié, et cloisonné. Nombre des filaments donnent par étranglement, bien que généralement en petit nombre, des cellules de levure. Au bout de 2 jours, on voit, à la surface, des voiles en îlots blancs et velus, composés de mycelium, où quelques-uns des filaments détachent des cellules de levure par étranglement. Si le repos dure 3 ou 4 jours, la surface entière se couvrira d'une formation assez forte et cohérente de mycelium, qui flotte à la surface du liquide et la hérisse d'îlots secs, blancs et inégaux, ayant un aspect légèrement velouté. Une végétation de surface préparée pour le microscope s'y est montrée comme mycelium typique fortement développé et à nombreuses cloisons. En pareil cas on constate également que surtout les bouts des filaments se scindent en cellules, qui s'arrondissent de manière à assumer la forme sphérique ou d'Oïdium. Ces cellules résultent soit d'étranglement, soit de scission, soit des deux; on en voit aussi qui naissent d'un simple bourgeonnement. En même temps que ces cellules se forment, elles se gonflent. Elles ont l'air très vigoureuses et sont pleines d'un plasma granulé fortement réfringent. Les filaments mycéliens, eux aussi, font voir des articles plus ou moins gonflés et remplis du même plasma très réfringent. Ajouté à la préparation, un peu d'une solution étendue d'iodure de potassium iodé, teint ces cellules plasmatiques plus fortement que le reste du mycelium et que les cellules ordinaires de levure, donnant aux premières une couleur jaune grisâtre marquée, tandis que le reste de la végétation n'est pour ainsi dire pas coloré. Un repos plus prolongé fait produire des spores à ces cellules plasmatiques, et plus on approche de cette phase qui donne les spores, plus leur coloration par l'addition d'iode sera intense. Lorsque la culture a reposé quelque 5 jours à

25 ° C., l'analyse y montre beaucoup desdites cellules en voie de donner des spores ou les ayant toutes développées, et durant les journées suivantes cette formation de spores augmentera beaucoup, et alors nous aurons un abondant développement. La spore, elle aussi, est teinte en jaune par l'iode. Aux diverses phases de l'évolution, on a ajouté de l'iodure de potassium iodé en dilution sans jamais observer la coloration en rouge

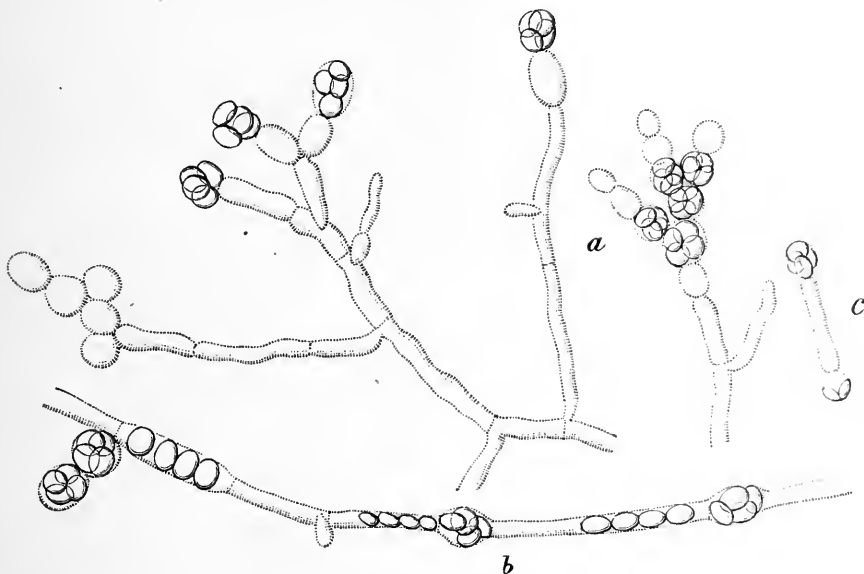


Fig. 3.

Végétations de spores. a, d'une culture sur eau de levure; b, d'une culture sur eau de levure gélatinisée et additionnée d'agar; c, d'une culture sur eau de levure. Ici, une spore germée a formé, en croissant, un filament mycélien, dans l'article terminal duquel de nouvelles spores viennent de se produire. ⁵⁰⁰/₁.

brun qui caractérise le glycogène. Ce n'est pas simplement dans les cellules de la surface que se forment les spores; on les retrouve aussi, mais naturellement en moindre abondance, dans le liquide nutritif même. On trouve presque constamment 4 spores en chaque asque. De temps à autre, on peut y en trouver un nombre moindre; mais en beaucoup de ces cas on verra que les spores en apparence manquantes sont présentes à l'état rudimentaire. Je n'en ai jamais compté plus de quatre dans un asque. En général, la formation des spores commence dans les cellules les plus rapprochées de l'extrémité libre du filament, et même très souvent dans la plus extérieure, pour avancer de plus en plus vers le centre. On peut même rencontrer

des articles munis de spores jusqu'au coeur de la masse mycélienne. Les parois de la cellule mère s'effacent assez rapidement, laissant les spores libres; le plus souvent elles restent groupées quatre à quatre.

Si dans une goutte d'acide sulfurique un peu fort l'on introduit un peu de cette abondante végétation de spores, la presque totalité du mycelium et des cellules de levure s'y dissolvent, surtout si l'acide est concentré, et il ne reste que les spores. Elles ont subi une légère diminution de volume; mais leur forme souffre remarquablement peu de ce traitement; c'est l'inverse de ce que j'ai obtenu d'autres champignons de levure et, chose à remarquer, la petite masse de spores en contact avec l'acide sulfurique prend une belle couleur rose bien accentuée. Ce ton ressort d'autant mieux que l'acide est plus fort. En ajoutant à une culture à spores sur eau de levure renfermée dans un flacon Freudenreich un peu d'acide sulfurique concentré, soit par ex. $\frac{1}{5}$ du volume de cette eau, nous obtiendrons, en secouant, un fort dégagement d'air, qui soulèvera les parties de végétation non dissoutes par l'acide sulfurique, c'est-à-dire les spores; celles-ci, arrivées à la surface, y resteront en petits grumeaux roses, et regagneront le fond dès que le dégagement d'air cessera. Ce dépôt rouge garde longtemps sa couleur sans altération; on l'a même constatée six mois après. Le lavage à l'eau d'un grumeau de spores coloré par l'acide sulfurique, fait disparaître la couleur; mais celle-ci revient par le traitement à l'acide. La réaction est aussi franche dans les cultures anciennes (1 an) à spores que dans les nouvelles. Elle est de toute beauté surtout quand on prend une culture à spores sur eau de levure gélatinisée et principalement sur ce substratum additionné d'agar, ces milieux favorisant beaucoup la croissance de ce champignon; il donne alors surabondance de spores. En faisant la culture, dans un flacon Freudenreich, par raies sur une couche inclinée de l'un des milieux susdits, et versant sur la végétation qui se produit ici un peu d'acide sulfurique concentré, elle prend une magnifique couleur rose qui tire un peu sur le bleu. En général, toutes les cultures riches en spores donnent cette réaction chromatique; telles aussi les cultures sur pain ou riz. En regardant au microscope les spores traitées par l'acide, on verra que dans celles qui restent isolées dans la préparation la teinte s'est seulement foncée, tandis que dans les endroits

où les spores se sont agglomérées la teinte rouge est manifeste. On a la même réaction colorée que ci-dessus par les acides nitrique, chlorhydrique et fluorhydrique concentrés.

La grande résistance dont les spores font preuve en face des acides concentrés, est certainement unique parmi les champignons de levure. Beaucoup de cultures riches en spores et appartenant à diverses espèces de *Saccharomyces* typiques ainsi qu'au *Schizosaccharomyces octosporus*, ont été essayées avec de l'acide sulfurique concentré, dans un but de comparaison, mais aucune n'échappe à ce résultat que soit la cellule végétative soit la spore ont été fortement attaquées ou même entièrement dissoutes par le traitement à l'acide. Ici il n'est pas question de coloration en rouge¹⁾.

Si, choisissant une culture riche en spores, par ex. sur eau de levure, on en fait une préparation ordinaire à l'eau, et qu'on arrête spécialement son attention sur les spores détachées, isolées, dont la plupart apparaissent rondes, tandis que l'aspect des autres tend plus à la forme ovale, un examen plus approfondi de ces dernières révélera en beaucoup d'entre elles une ligne transversale fine qui partage la spore ovale en deux parties généralement inégales; on ne voit rien de tel sur les spores rondes. L'addition d'un peu d'iodure de potassium iodé en dilution, rend cette ligne un peu plus manifeste. En refaisant cette opération, mais avec une goutte de liquide plus grosse pour y permettre une circulation facile des spores ainsi mises en mouvement, on constate cette ligne sur toutes les spores vues de profil, ligne fine qui paraît claire ou sombre suivant la mise au point, et qui fait le tour de la spore. C'est par exception qu'elle en occupe le milieu: en général, elle divise la spore en un gros

¹⁾ Outre les levures susmentionnées, on a également examiné l'influence de l'acide sulfurique concentré sur diverses moisissures, telles des végétations des *Penicillium Wortmanni*, *Gymnoascus flavus*, *Anixiopsis stercoraria*, *Aspergillus glaucus* et *Sterigmatocystis nidulans*. Toutes ces végétations présentaient une abondante fructification par asques. Les végétations des deux premières espèces furent entièrement dissoutes par l'acide, tandis que pour les trois dernières les ascospores échappaient à son action dissolvante. D'autre part, tandis que chez l'*Anixiopsis stercoraria* et l'*Aspergillus glaucus* ces organes sont demeurés incolores, chez le *Sterigmatocystis nidulans* ils ont pris une couleur violette tirant sur le bleu, ce qui constitue donc une nouvelle réaction chromatique.

segment et un petit, et si, dans la première préparation, cette ligne n'est pas visible sur la plupart des spores — surtout celles qui paraissent rondes —, la raison en est simplement que d'ordinaire la spore cherche à occuper dans la préparation une position telle que le plan de cette ligne annulaire soit horizontal, ce qui la fait coïncider avec le contour de la spore, cette dernière ayant une partie plus lourde. Vue de dessus, l'ascospore paraît donc circulaire, et son profil est plutôt oval, comme celui d'une boule un peu aplatie.

Or, que signifie cette ligne annulaire? Pour résoudre cette question, l'on a commencé par essayer de faire germer la spore,

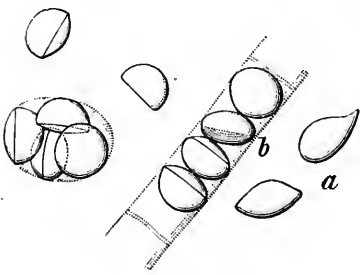


Fig. 4.
Spores. a, formes irrégulières.
1000/1.

chose facile si l'on sème en moût de bière des spores mûres dans une chambre Ranvier. Si armé d'un microscope on surveille la germination dans cette chambre à la température du laboratoire, surtout en notant les spores dont le profil montre la transversale mentionnée, on verra dès la 4^e ou 6^e heure écoulée, les spores qui commencent à gonfler, la membrane se rompant alors suivant cette ligne. La

spore est à double paroi et par conséquent munie d'un exosporium et d'un endosporium. L'exosporium se compose de deux valvules généralement inégales, qui s'appliquent l'une contre l'autre suivant une suture, qui le plus souvent a l'aspect d'une ligne fine, bien qu'en certains cas elle puisse aussi affecter la forme d'une nervure faisant le tour de la spore. En d'autres cas, la seule distinction des deux valvules de l'exosporium est que sous un certain jour la spore présente une moitié sombre et l'autre claire (fig. 4 b). La germination déchire l'exosporium de la spore suivant la suture. Ordinairement les deux valvules restent unies en un point, imitant les deux valves d'une coquille de moule, autour de la cellule gonflée. Peu après, l'on aperçoit sur celle-ci un petit bourgeon qui se forme et en quelques heures atteint des dimensions et pousse lui-même de nouveaux bourgeons; la spore elle-même peut aussi en émettre plusieurs. Si l'on suit ainsi la germination des spores dans la préparation au moût, on verra qu'elle procède par bourgeonnement

ordinaire, comme le montre la fig. 5. L'exosporium reste longtemps fixé sur la spore bourgeonnante.

Mûres et complètement développées, les spores sont pleines d'un plasma homogène, fortement réfringent, où l'on voit habituellement un ou plusieurs grains encore plus réfringents. De grandeur très variable, elles peuvent avoir un diamètre maximum d'environ 5 à $6\frac{1}{2} \mu$; mais d'ailleurs on peut trouver des spores d'un diamètre entre $3\frac{1}{2}$ et 8μ . L'ensemble de la forme est assez régulier; mais de

temps à autre on peut rencontrer des spores d'aspect un peu irrégulier, comme on le voit en fig. 4, a. Les types reproduits ici peuvent se rencontrer dans toutes les cultures; mais c'est surtout dans les cultures sur blocs de plâtre qu'on les a trouvés fréquemment. Un traitement spécial fait constater que chez quelques-unes la suture occupe le

bord du côté plat, tandis que dans d'autres, même après due préparation, cette suture est invisible, bien qu'on ne puisse pas douter qu'elle existe réellement. En somme, il n'est pas toujours aisé de voir cette formation, surtout tant que la spore est encore dans l'asque. Pour bien l'étudier, ce qu'il y a de mieux à faire est de partir d'une culture sur un substratum contenant de l'eau de levure. Dans les cas où la suture des spores s'aperçoit nettement pendant qu'elles sont encore dans leurs asques, on a constaté que la position de telle ou telle spore par rapport aux autres dans la cellule mère est assez fortuite et dépend en partie de la forme de cette dernière.

La structure de la spore peut aussi être observée d'une manière autre que celle ci-dessus indiquée. Ainsi, en faisant une préparation de culture à spores dans une goutte d'acide sulfurique concentré, l'observateur au microscope distinguera très nettement la suture, surtout s'il coude son instrument horizontalement. La préparation sera le théâtre d'une certaine circulation, qui fera voir telle spore de différents côtés et, comme le

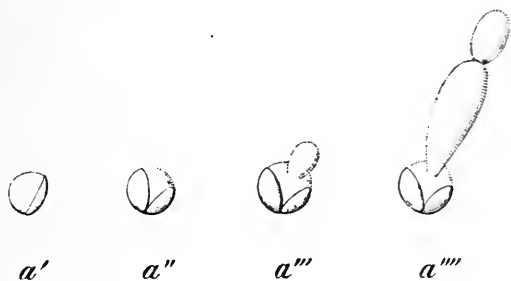


Fig. 5.

Spore en germination en chambre Ranvier avec du moût de bière, à la température ordinaire du laboratoire. a'' au bout de 2, a''' au bout de 4, a'''' au bout de 9 heures.
1000/1.

plan de la suture de la spore se place volontiers horizontalement, on y gagne précisément une chance de bien voir de profil cette formation. En baissant avec précaution le tube du microscope de manière à l'appuyer légèrement contre le couvre-objet, on peut obtenir que dans la préparation en question l'exosporium de la spore se partage suivant la suture. Les deux valvules de cet exosporium se placent alors comme les deux valves d'une coquille de moule se tenant par la charnière, ou séparées l'une de l'autre si la pression a été trop forte. On n'a rien constaté dans la cellule; son contenu a dû être dissous par l'acide. En traitant par l'acide sulfurique, on notera également que l'une des valvules de l'exosporium, la plus grande, est aussi la plus épaisse. Le maximum d'épaisseur ainsi constaté dans la paroi de l'exosporium, a été d'environ $1\ \mu$. Si une spore n'a pas été traitée par le susdit acide, on ne peut pas la faire éclore par pression suivant la suture. Soumise à cette pression, elle se délayera simplement, sans aucune séparation en exosporium et endosporium.

C'est donc l'exosporium que le traitement par l'acide sulfurique teint en rouge. Je n'ai découvert nulle part de mention relative à cette réaction sur les spores de champignons; en tout cas, jamais encore on ne l'a observée chez les champignons de levures. Par contre, on l'a observée chez beaucoup de spores d'autres plantes et de grains de pollen¹⁾. La réaction colorante est attribuée à ce que ces organes seraient pourvus d'une membrane cutinisée, insoluble dans l'acide concentré, et ce serait ainsi cette membrane que l'acide colorerait en rouge.

Ce qui précède permet d'admettre que dans mon espèce de levure l'exosporium des spores contient une substance subérisée. Nombre d'autres réactions viennent encore corroborer cette hypothèse. Ainsi les spores sont colorées en brun jaunâtre par l'iode joint à l'acide sulfurique étendu et de même par le chlorure de zinc iodé; dans l'acide chromique concentré elles ne se dissolvent qu'après y avoir séjourné quelque temps, et elles sont insolubles dans un liquide cupro-ammoniacal; quand on les chauffe dans une forte lessive de potasse, on a une réaction qui colore fortement en jaune.

¹⁾ J. Sachs, Lehrbuch der Botanik, 1873, p. 35 et 36.

W. Behrens, Hilfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen im botanischen Laboratorium, 1883, p. 297.

La présence de cette membrane cutinisée met la spore en état de bien résister à l'influence des agents extérieurs, tels que l'humidité, la dessiccation, la putréfaction, etc.

Les expériences faites en chambre humide sur la germination des spores méritent une plus ample mention. Ainsi, en semant sur moût de bière dans une chambre Ranvier quelques spores, qu'il vaut mieux tenir séparées, tout au plus en groupes

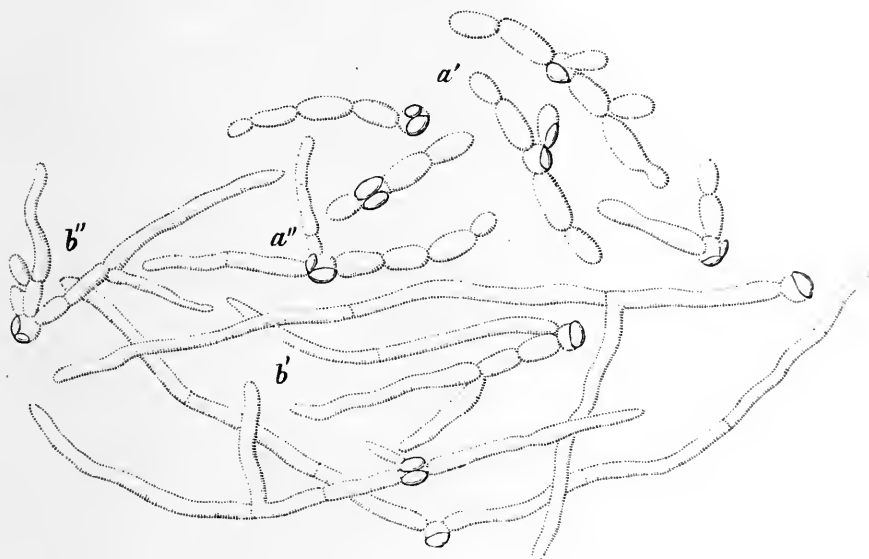


Fig. 6.

Des spores en germination. a' au bout de 24 heures, a'' au bout de 42 heures sur moût; b' au bout de 24 heures, b'' au bout de 42 heures sur eau de levure. Température ordinaire du laboratoire. ⁵⁰⁰/₁.

de quatre, et maintenant la chambre à la température du laboratoire, on verra qu'en 4 ou 6 heures la plupart des spores débiteront par germer, par voie de gonflement et éclatant l'exosporium en deux parties, puis pousseront des bourgeons. Durant les heures suivantes, ce bourgeonnement se poursuit très activement (fig. 6, a'). Toutefois, on notera que pendant la deuxième journée, si les cellules de levure continuent à croître, c'est par ce que chaque cellule à part elle s'étend de plus en plus en longueur, c'est-à-dire assume la forme de filament mycélien et se cloisonne; en d'autres termes, la tendance devient alors de former un mycelium, et les spores qui alors seulement commencent à germer, vont le faire de cette même manière; elles pousseront d'abord un petit bourgeon, qui va s'al-

longer et former un long fil, d'où peuvent partir des branches latérales, et qui se cloisonnent. Toutefois, ces fils de mycelium peuvent souvent pousser sur les côtés des cellules de levure. En général, le mode d'évolution est comme ci-dessus, mais on n'en pourra pas moins voir nombre de spores en germination qui pendant quelque temps encore continueront à pousser de vrais bourgeons, ou bien il pourra encore se faire que la propagation ait lieu de l'une et l'autre manière (fig. 6, a"). On n'a jamais observé de formation vraie de tubes germinatifs dans la germination de spores appartenant à la levure en question. Si la culture séjourne plus longtemps, les long fils de mycelium cloisonnés, et surtout ceux des colonies les plus rapprochées des bords de la chambre Ranvier, c'est-à-dire là où l'air a le meilleur accès, se diviseront en grandes cellules rondes, et le mycelium tendra à se scinder suivant les cloisons en articles plus indépendants, ressemblant un peu à ceux de l'Oïdium et faciles à séparer. Sept jours d'abandon permettent de constater la formation d'ascospores au nombre de quatre en beaucoup de ces grandes cellules rondes, ainsi que dans nombre des parties de mycelium limitées par deux parois transversales

Si, à la température ordinaire du laboratoire, l'on ensemence de la même manière quelques spores dans une chambre Ranvier renfermant de l'eau de levure, au bout de 4 à 6 heures elles se montreront également en voie d'éclater l'exosporium en deux parties, pour pousser un petit bourgeon durant les heures suivantes. Mais ce même bourgeon va s'accroître et s'étendre de plus en plus jusqu'à devenir un fil, qui se cloisonne (fig. 6, b"). Ici il y a tendance à formation de mycelium, à l'inverse de la culture sur moût en chambre Ranvier où, comme nous l'avons vu, la première journée fait constater une tendance exclusive à former des cellules de levure. Dans cette eau de levure on peut pourtant trouver aussi un bourgeonnement seul ou avec formation de mycelium (fig. 6, b"), mais en somme ici la formation des cellules de levure est purement secondaire. Trois jours de plus, et l'on constate que de nombreux fils de mycelium ont l'article terminal gonflé et comblé de plasma. Puis, les jours suivants amènent un ample développement de grandes cellules, pleines de plasma et généralement rondes, le plus souvent au bout des fils. Ces cellules proviennent d'un étranglement ou d'une scission des articles de mycelium ou d'un terme moyen entre

ces deux états. Enfin elles peuvent aussi être le fruit d'un bourgeonnement ordinaire. On voit aussi dans les parties des fils mycéliens les plus éloignées du bout, des articles particulièrement riches en plasma et plus ou moins enflés. On peut très aisément suivre sur la platine du microscope l'évolution ultérieure de ces cellules où abonde le plasma: on l'y voit, grenu et grumeleux, onduler avec lenteur et sans cesse et finir par se prendre en masses définies assez sombres, qui en peu d'heures s'accroissent par degrés en quatre rudiments de spores ordinairement, celles-ci évoluant alors jusqu'à maturité. Au bout d'environ 7 jours, on constate dans la chambre Ranvier une très copieuse sporulation.

En chambre Böttcher à ensemencement de spores peu nombreuses dans l'eau de levure gélatinisée, il y avait évolution de colonies composées presque exclusivement de mycelium typique. C'était par pure exception qu'on y trouvait quelques cellules de levure. Un abandon de huit jours à la température du laboratoire, produisit dans cette culture une exubérante et belle formation de spores, et cette formation se présentait surtout fréquemment dans les articles des filaments.

Un plus long séjour de pareilles cultures à spores dans les chambres humides fait dissoudre la paroi de la cellule mère, et alors les spores sont dégagées, groupées en général par quatre.

En poursuivant ainsi au microscope les phases de l'évolution, l'on peut aussi se convaincre que la formation d'asques n'est précédée d'aucune fusion de deux cellules, conséquemment, d'aucune copulation. J'avais arrêté mon attention spécialement sur ce point, puisque chez quelques autres levures on a récemment observé des formations de fusions qui, au sens de certains savants, doivent être interprétées comme dénotant une propagation par accouplement.

Par contre, si l'on sème dans une chambre humide un grand nombre de spores, l'état des choses se complique de suite. Alors les spores se dépouillant mutuellement d'air et de principes nutritifs — entre autres du sucre fermentescible dont il est question à propos du moût ou d'autre liquide nourricier analogue —, influent considérablement sur le type de croissance. Ainsi, en semant une quantité extraordinaire de spores dans une chambre Ranvier renfermant du moût, on les verra germer par un petit bourgeon qui, cependant, va s'allonger de manière à

former des filaments mycéliens, à l'instar de ce qui se passe dans l'eau de levure. Si l'on ensemence ce dernier milieu d'un grand nombre de spores, on constate que celles qui se trouvent le plus près du bord, germent de la manière ordinaire, en poussant un bourgeon, qui s'allonge en un fil cloisonné; mais plus nous approchons du milieu de la chambre Ranvier, plus la germination est lente, et au centre de la chambre les spores ne germent pas du tout. Dans une pareille culture la croissance est vite terminée. Ainsi, dans une culture en eau de levure ensemencée de beaucoup de spores, on a trouvé, après 2 jours d'abandon à la température ordinaire du laboratoire, la colonie que montre fig. 3, c. Ce type d'évolution était assez commun dans cette culture.

Comme on le voit par ce qui précède, la marche de l'évolution dans les cultures en chambres renfermant du moût de bière ou de l'eau de levure, pourvu qu'on n'ensemence pas un trop grand nombre de spores, est essentiellement la même que dans les cultures correspondantes des flacons; en d'autres termes, dans le moût, qui contient du sucre fermentescible, la croissance procède d'abord principalement par un bourgeonnement ordinaire, tandis que dans l'eau de levure elle procède de préférence par la formation de mycelium. Quant aux autres solutions nutritives qui contiennent un des sucres que la levure en question est capable de faire fermenter (voir plus bas), la marche de l'évolution est la même que dans le moût. Dans les liquides qui ne contiennent pas de sucre fermentescible, l'évolution sera essentiellement analogue à celle que présente l'eau de levure.

Même sur les terrains nutritifs solides, tels que le moût gélatinisé seul ou à l'agar, le *Saccharomycopsis capsularis* vient vite et avec facilité, surtout si les cultures y sont installées par raies.

Sur le moût gélatinisé, cette nouvelle levure débute par former une végétation sèche, légèrement veloutée, inégale et fortement plissée, d'une couleur blanc grisâtre. Elle se compose d'un mycelium détachant des cellules de levure, et de cellules de levure bourgeonnantes. La phase de la sporulation, avec arrondissement des articles du mycelium, commence bientôt après, et déjà au bout de 4 jours, à une température de 25 ° C., il s'est formé quantité de spores. La végétation s'enfonce bientôt dans la gélatine et liquéfie celle-ci.

Sur le moût gélatinisé à l'agar, elle se multiplie promptement et avec une vigueur toute particulière, sans liquéfier la substance nutritive. La jeune végétation, qui présente un aspect sec, fortement plissé, inégal et légèrement velouté, est d'une couleur blanc grisâtre, tirant sur le brun-rouge. En poursuivant sa croissance, elle s'élève au-dessus du terrain nourricier sous forme d'une couche épaisse, qui finit par prendre une couleur de chocolat; peu à peu, son aspect devient un peu luisant d'humidité. Vue au microscope, la végétation présente le même aspect que sur le moût gélatinisé sans agar, et un repos prolongé donne beaucoup de spores.

Sur l'eau de levure gélatinisée seule ou additionnée d'agar, la croissance est aussi bonne, et l'aspect de la végétation rappelle celle qui se développait sur le moût gélatinisé, avec cette différence que la couleur tire un peu sur le rouge, et que la couche qu'elle forme sur l'eau de levure gélatinisée à l'agar est plus égale et mince. L'eau de levure gélatinisée se liquéfie bientôt; mais additionnée d'agar, elle reste à l'état solide. Avant la phase de la sporulation, la végétation est formée simplement d'un mycelium typique; toutefois, par pure exception, on peut rencontrer isolément sur l'eau de levure gélatinisée une cellule de levure détachée du mycelium. A la température de 25 ° C., on voit sur cette substance au bout de 3 à 4 jours, et quand elle est additionnée d'agar au bout de 2 à 3 jours, les articles des filaments du mycelium en voie de s'arrondir de façon à former les cellules ordinaires comblées de plasma. Alors il s'est déjà produit de nombreuses spores, et l'on en rencontre même de détachées et mûres, le plus souvent groupées par quatre, la paroi de la cellule mère s'étant dissoute. Sur ces deux substratums d'eau de levure, la sporulation est extraordinairement riche: surtout sur celle additionnée d'agar, on finira par trouver presque exclusivement des cellules sporogènes et des spores détachées. Ces organes se forment de la manière ordinaire; mais ici on en rencontre très souvent même dans les articles du mycelium, ce qui est assez rare dans les milieux précédemment nommés.

Sur le pain de seigle et sur le riz, la croissance du *Saccharomycopsis capsularis* est également assez bonne et présente des phénomènes ayant de l'analogie avec ceux observés sur les milieux solides d'eau de levure. La végétation finit par

prendre une teinte brunâtre, et il se produit de nombreuses spores. Ma levure ne liquéfie pas l'amidon.

Outre les milieux déjà mentionnés, j'ai également essayé une solution de peptone dans du bouillon de boeuf, un extrait de fumier de vache et une décoction de foin. Sur les deux premiers de ces milieux, notamment sur le bouillon, notre levure vient mal et ne croît qu'avec une extrême lenteur. Par contre, la croissance est passablement bonne dans la décoction de foin, au sein de laquelle il se produit un développement manifeste de mycelium accompagné de quelques cellules de levure, en même temps que la surface se couvre d'un voile assez compact, où un repos un peu prolongé donne de nombreuses spores. Les deux derniers liquides nutritifs ont été essayés principalement en considération du lieu où cette levure avait été découverte: des pâturages élevés dans les Alpes. Les recherches de Hansen sur la circulation des *Saccharomycètes* dans la nature, nous ont appris non seulement que les foyers primaires de ces organismes sont des fruits doux et juteux, mais encore qu'ils ont des foyers secondaires, spécialement dans les liquides du sol, et surtout dans les extraits de fumier et de parties végétales¹⁾.

Nous avons vu plus haut que toutes les végétations superficielles présentent un aspect plus ou moins velouté. Cette apparence est causée par des filaments mycéliens qui s'élèvent en l'air, soit isolément, soit en faisceaux. En installant avec précaution sous l'objectif d'un microscope (sans employer de couvre-objet) une petite portion d'une pareille culture superficielle veloutée, de façon que la végétation ne soit pas dérangée, on peut observer ces formations mycéliennes. On aperçoit nettement les filaments parallèles, ainsi que leurs cloisons. En outre, surtout si la végétation provient d'une culture sur moût, on peut souvent constater que quelques-uns des filaments constituant la face extérieure d'un faisceau détachent par étranglement quelques cellules de levure. Dans une préparation ordinaire sous couvre-objet, lesdites formations n'apparaissent pas, parce que dans ces conditions les filaments se séparent de suite.

¹⁾ Emil Chr. Hansen, *Neue Untersuchungen über den Kreislauf der Hefenarten in der Natur* (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2te Abth. X, I (1903)).

Par les modes de culture variés ainsi de diverses manières, j'ai obtenu constamment l'apparition des formations ci-dessus décrites, et d'elles seules, c'est-à-dire formation de cellules de levure et de mycelium et des ascospores, sans aucune forme de moisissure ou d'un autre type.

Un examen de l'action du *Saccharomycopsis capsularis* sur les différentes espèces du sucre fait constater qu'il peut faire fermenter le maltose, le dextrose, le lévulose et le d-galactose, et qu'il n'est pas capable de faire fermenter les l-arabinose, raffinose, lactose et saccharose; quant à ce dernier sucre, il est aussi incapable de l'intervertir. Dans de l'eau de levure additionnée de l'un des quatre sucres fermentescibles par le *Saccharomycopsis capsularis*, sa propagation est rapide et luxuriante, et la fermentation qu'il provoque, se manifeste nettement. La propagation procède de la même façon que dans le moût de bière: elle commence par un bourgeonnement actif, en sorte qu'il se forme un copieux dépôt de levure, en même temps que la surface se couvre peu à peu d'un voile. Ce dernier, qui est moins compact que ceux qui envahissent les cultures sur moût, est formé, à l'instar de ceux-ci, d'un mycelium dont les articles s'arrondissent peu à peu. Après un certain espace de temps, il y a souvent formation de quelques spores.

En eau de levure additionnée de l-arabinose, de raffinose, de lactose ou de saccharose, la croissance est très bonne; mais, contrairement à ce qui se passe dans les liquides contenant du sucre fermentescible par cette levure, dans lesquels, comme nous l'avons vu, il se produit un bourgeonnement abondant, des liquides contenant des sucres non fermentescibles par elle ne donnent naissance qu'à peu de bourgeonnement proprement dit. En revanche, il se produit au sein du liquide un abondant développement de mycelium. Dans l'eau de levure additionnée d'arabinose ou de raffinose, la végétation superficielle réussit à peine à masquer la surface entière, et dans ces deux milieux son aspect est un peu plus velu que dans les précédents. Dans l'eau de levure additionnée de lactose il n'y a pas de formation superficielle proprement dite, analogue à celle des autres liquides, mais seulement un développement bien marqué de mycelium, qui affleure la surface sans s'élever au-dessus. Si

des cultures dans ces liquides sont exposées pendant quelque temps à la température ordinaire du laboratoire, il se développe dans le voile une foule de spores. — Dans l'eau de levure additionnée de saccharose, le *Saccharomycopsis capsularis* forme un voile cohérent, assez compact, un peu inégal, sec et blanc, qui couvre toute la surface et se compose de mycelium qui, comme à l'ordinaire, s'étrangle peu à peu et s'arrondit, suivant les cloisons transversales, en articles. Un repos un peu prolongé donne de nombreuses spores.

Outre les substances susnommées, j'ai essayé aussi de l'eau de levure additionnée de mannite ou de dextrine. Ma levure n'a pu faire fermenter ni l'une ni l'autre. Dans ces solutions, la croissance est essentiellement la même que dans l'eau de levure additionnée d'arabinose ou de raffinose; seulement la végétation superficielle est encore plus épaisse et plus velue.

Quand un séjour prolongé de cultures à formation de voile a donné dans celui-ci un très grand nombre de spores, le voile prend ordinairement une couleur d'un brun clair.

Dans le moût de bière où, comme nous l'avons vu, le *Saccharomycopsis capsularis* vient vite et vigoureusement, j'ai trouvé pour la croissance végétative les températures principales suivantes:

Optimum	25—28° C.
Maximum	env. 38 $\frac{1}{2}$ ° »
Minimum	moins de 1 $\frac{1}{2}$ ° »

Les déterminations faites relativement aux limites de température de la formation de voile, ont donné pour résultat qu'il s'était formé quelques voiles en îlots

au bout de 11 jours à	34—35° C.
» 9 mois à	3—4° »

A 36° et à 1 $\frac{1}{2}$ °, il n'y avait pas formation de voile.

On sait que c'est en installant les cultures sur bloc de plâtre qu'on obtient, dans les *Saccharomyces* proprement dits, les meilleures conditions du développement de spores. Aussi la plupart des déterminations relatives aux spores ont-elles été faites de cette manière. Bien que, pour la levure qui nous

occupe, la culture sur plâtre donne une sporulation moins abondante que sur les milieux solides à eau de levure, j'ai employé aussi, dans un but de comparaison, la culture sur bloc de plâtre, afin de déterminer l'influence de la température sur la formation de spores. Toutefois, j'ai constaté que cette formation avait les mêmes températures fondamentales, n'importe quels fussent ceux des milieux précités où se fit la culture. Voici ce que j'ai trouvé pour ces températures principales de la formation de spores:

Optimum . . . 25—28 ° C.

Maximum . . 34¹/₂—35 ° »

Minimum . . . 5—8 ° »

La température optima de la sporulation sur bloc de plâtre et sur les milieux susnommés à eau de levure, semble coïncider avec l'optimum de la croissance végétative. Il paraît qu'à la température ordinaire d'un appartement il se produit aussi des spores en quantité égale; mais dans ce cas le développement est un peu plus lent. — Il est à remarquer ici que dans les cultures faites sur bloc de plâtre la suture de la spore ressort moins nettement ou pas du tout, même après traitement par une solution d'iode ou par acide sulfurique. Dans ces cultures il apparaît aussi, comme nous l'avons vu plus haut, des formes irrégulières de spores.

Les déterminations ci-dessus mentionnées fournissent des éclaircissements non-seulement sur la classification de la nouvelle espèce, mais encore sur la biologie générale des *Saccharomycètes*. On sait que Hansen, en 1886 (*Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg II*, 106), et plus tard, s'appuyant sur nombre de preuves expérimentales (*Comptes-rendus du Lab. de Carlsb. V*, 68 (1902)), établissait cette thèse applicable à tous les *Saccharomycètes* que la température maxima de la sporulation est inférieure à celle du bourgeonnement, et que la température minima de la sporulation est supérieure à celle du bourgeonnement. Les analyses décrites dans ce qui précède, corroborent ces assertions.

Nous avons vu que le *Saccharomycopsis capsularis* fait fermenter le moût de bière. Ainsi, dans un moût d'env. 13,5 % Ball., j'ai trouvé

après 27 jours d'exposition à la température ordinaire du laboratoire

			5,66 % en vol. d'alcool		
—	4 mois	—	—	6,92	—
—	7 —	—	—	7,15	—
—	10 —	—	—	6,88	—

Dans ce cas la limite de la production d'alcool se trouve donc aux environs de 7 %.

Dans de l'eau de levure additionnée de 20 % de dextrose j'ai trouvé

après 7 mois d'exposition à 25 °			6,88 % en vol. d'alcool		
—	10 —	—	—	7,23	—

Ici encore, la limite paraît se trouver à 7 % environ.

Nous allons maintenant examiner de plus près les résultats de mes recherches microscopiques et expériences physiologiques sur le *Saccharomycopsis capsularis*. Si, donnant un coup d'oeil rétrospectif, nous nous demandons quels sont les caractères essentiels qui distinguent cette levure nouvelle de toutes les autres, je peux remarquer que ce qui m'a frappé de prime abord, c'était l'ensemble de sa façon de croissance, la végétation, en s'élevant au-dessus de la surface du milieu nutritif, ayant un aspect velouté et présentant, vue au microscope, un développement très fort et bien marqué de mycelium. Toutefois, ces propriétés, si bien prononcées qu'elles soient, ne constituent en réalité nullement une différence essentielle entre cette levure et les vrais *Saccharomyces*; elle a de commun avec ceux-ci des caractères aussi importants que le bourgeonnement et la sporulation et, en outre, le développement de mycelium. Hansen a été le premier qui a constaté des formations mycéliennes dans le genre de *Saccharomyces*, particulièrement chez le *Saccharomyces Marxianus*, la levure basse de Carlsberg N° 1 et le *Saccharomyces Ludwigii*¹⁾, dans de vieux voiles et dans de vieilles cultures sur milieu nutritif solide. Même quand de vieilles spores du *Sacch. Ludwigii* germaient, il constatait qu'elles

¹⁾ Voir, pour la première des trois levures ici citées, les Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg II, 145 (1888), et V, 4 (1900); pour la deuxième, les mêmes Comptes-rendus II, 42 (1883), et pour la troisième, III, 56 (1891), ainsi que le Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. V, 664 (1889).

sont susceptibles de développer un mycelium typique et cloisonné. Plus tard, des formations analogues chez les autres *Saccharomyces* proprement dits, ont été aussi décrites par Will, Lindner, et d'autres. Il appert donc que ces formations mycéliennes sont actuellement bien connues dans le genre *Saccharomyces*; seulement, elles sont moins bien prononcées.

Il ressort donc de ce qui précède que la levure décrite dans ce mémoire a bien des caractères de commun avec les véritables *Saccharomyces*; mais la plus forte raison pour empêcher de la rattacher à ce genre, dont cependant elle se rapproche tant, est la structure ci-devant décrite de la spore; car cette structure se distingue de celle de toutes les levures connues jusqu'ici¹⁾.

En dehors de l'espèce qui m'occupe, la littérature ne connaît qu'une levure dont les spores aient également deux membranes; mais ces deux espèces divergent fortement l'une de l'autre par toute une série de caractères, et surtout par le fait que l'autre espèce n'a pas l'exosporium divisé en valvules.

Cette espèce est celle que Robin a introduite dans la littérature sous le nom de *Cryptococcus guttulatus*²⁾. Plus tard, des savants l'ont dénommée *Saccharomyces guttulatus*, et Buscalioni³⁾ constata qu'elle développe des endospores. Dequis lors, Wilhelmi⁴⁾ a réussi à faire germer ces endospores. D'après ses observations, ces organes sont munis d'une membrane double. La spore affecte ce mode de germination qu'elle se gonfle et que par là la membrane extérieure se brise en un point quelconque. Le germe pousse hors de l'ouverture, et la membrane rompue et renversée se rétrécit peu à peu en un petit reste de forme indéfinie. La germination et la croissance ultérieure ont lieu par bourgeonnement. Il n'y a pas, à la membrane extérieure de la spore, de formation de suture analogue à celle que nous avons constatée chez le *Saccharomycopsis capsularis*.

¹⁾ Une recherche et un aperçu de la structure et de la germination des spores chez les *Saccharomyces*, ont été donnés par Hansen dans les Comptes-rendus du Lab. de Carlsb. III, 44 (1891).

²⁾ Robin, Des végétaux qui croissent sur les animaux vivants. (Paris 1847).

³⁾ L. Buscalioni, Il *Saccharomyces guttulatus* Rob. (Malpighia N, 281 (1896)).

⁴⁾ A. Wilhelmi, Beiträge zur Kenntnis des *Saccharomyces guttulatus* (Buscalioni). (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2te Abth. IV, 305 (1898)).

Du moment que la spore du *Saccharomyces guttulatus* possède les deux membranes de l'espèce décrite par moi, je les considère toutes deux comme appartenant au même genre. Me basant sur la ressemblance de ce genre au *Saccharomyces*, je lui ai donné le nom de *Saccharomycopsis* et, comme nous l'avons déjà vu, elle entre naturellement comme genre nouveau dans la famille des *Saccharomycètes*. Quant au nom spécifique de la nouvelle levure: *Saccharomycopsis capsularis*, je l'ai choisi à cause de la structure et la germination particulières de la spore, qui avec ses deux valvules déhiscentes a tant de rapport avec les capsules de certaines plantes supérieures¹⁾.

J'ajouterai ici une description systématique de ce nouveau genre et des deux espèces qu'elle comprend.

***Saccharomycopsis*, novum genus.**

Levures bourgeonnantes et donnant des endospores. La spore est munie de deux membranes et germe par bourgeonnement.

Saccharomycopsis guttulatus (Robin), Schiön.²⁾

(Synonymes: *Cryptococcus guttulatus*, Robin; *Saccharomyces guttulatus*, aut.)

Cellules ellipsoïdes, ou ovales-oblongues. Chaque asque renferme 1 à 4 spores. Quand la spore germe, l'exosporium se rompt en un des pôles ou latéralement, et le bord est toujours irrégulier. L'exosporium, se resserrant insensiblement, finit par former un petit reste amorphe. Température optima de la croissance végétative: 35 à 37° C.

Intervertit le saccharose. Fait fermenter le dextrose.

Se trouve dans le canal digestif des lapins et, plus rarement, des cobayes, comme aussi dans les excréments de ces animaux.

Se développe sur certains milieux nutritifs artificiels, p. ex. la glycérine à agar additionnée d'acide tartrique et de dextrose.

¹⁾ On peut obtenir le *Saccharomycopsis capsularis* en s'adressant au laboratoire de M. Král de Prague.

²⁾ Je donne la description de cette espèce d'après les mémoires de Buscalioni et de Wilhelmi (voir au bas de la page 123), ainsi que d'après L. Buscalioni e O. Cassagrandi, Sul *Saccharomyces guttulatus* (Rob.) (Malpighia XII, 59 (1898)).

Saccharomycopsis capsularis, n. sp.

Mycelium typique et bourgeonnement. Ordinairement 4 spores dans chaque asque. La forme ordinaire de la spore est celle d'une boule aplatie, d'un diamètre de $3\frac{1}{2}$ à $8\ \mu$. Quand la spore germe, l'exosporium s'entr'ouvre en formant deux valvules ordinairement inégales, qui le plus souvent restent unies en un point et demeurent attachées pendant longtemps à la spore germée. L'exosporium est teint en rose par l'acide sulfurique et par certains autres acides minéraux. Température optima de la croissance végétative: 25 à 28° , maxima: $38\frac{1}{2}^{\circ}$, minima: moins de $\frac{1}{2}^{\circ}$ C. Température optima de la sporulation: 25 à 28° , maxima: $34\frac{1}{2}$ à 35° , minima: entre 5 et 8° C. Les milieux liquides se couvrent promptement d'un voile bien marqué, blanc, inégal et velu, les milieux solides présentant également une végétation blanche, veloutée, plus ou moins inégale, qui sur le moût gélatinisé additionné d'agar prend au bout de quelque temps une couleur de chocolat.

Fait fermenter les maltose, dextrose, lévulose et d-galactose, mais non les l-arabinose, raffinose, lactose et saccharose. Ne sécrète pas d'invertine.

Découvert dans de la terre prise à un pâturage élevé des Alpes suisses.

Se développe bien dans moût de bière, eau de levure seule ou bien additionnée d'un des sucres précités ou de dextrine ou de mannite; de plus, sur moût gélatinisé seul ou à agar, eau de levure gélatinisée seule ou à agar; enfin sur riz et pain.

Septembre 1903.

SUR LA MÉTHODE DE KJELDAHL POUR LE DOSAGE DE L'AZOTE

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET C. PEDERSEN.

Dans un mémoire qui a récemment paru dans la *Zeitschrift für physiol. Chem.*¹⁾ MM. Fr. Kutscher et H. Steudel ont publié de nombreuses analyses par lesquelles ils cherchent à démontrer que la méthode de Kjeldahl pour le dosage de l'azote, bien qu'applicable aux matières hétérogènes telles que la viande, le pain, l'urine etc., ne l'est nullement quand on a à analyser des composés chimiques déterminés. Ces deux auteurs se sont appliqués à déterminer par la méthode de Kjeldahl la teneur en azote de certains corps d'une haute importance au point de vue physiologique, tels que créatine, créatinine, acide urique, lysine et histidine. Mais ils sont toujours arrivés à des résultats fort variables: quelquefois ils ont trouvé une teneur en azote se rapprochant de celle donnée par le calcul; mais plus souvent ils ont trouvé une teneur trop basse d'un ou plusieurs pour cent, et dans quelques-unes de leurs analyses elle ne s'élevait qu'à $\frac{3}{4}$ ou $\frac{2}{3}$ de celle que leur avait donnée la théorie.

Or, si ces résultats étaient réellement sûrs, c'est-à-dire, s'ils étaient trouvés par un emploi juste et exact de la méthode de Kjeldahl, les deux auteurs étaient dans leur droit en rejetant cette méthode, non seulement pour l'analyse de composés chimiques déterminés, mais pour le dosage d'azote en général, toutes les fois qu'il s'agirait d'analyses tant soit peu exactes. Mais il n'en est pas ainsi. Il ressort des éclaircissements — peu abondants du reste — que donnent les auteurs sur le procédé

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 12 (1903).

qu'ils ont suivi, qu'ils doivent s'être écartés, sur plus d'un point essentiel, non seulement de la méthode originale de Kjeldahl, mais aussi des modifications qu'on y a apportées ultérieurement. Ceci est vrai (en ce qui concerne nombre des essais faits par les deux auteurs) pour la durée du chauffage, et particulièrement pour la manière dont ils ont effectué l'oxydation par le permanganate de potasse.

D'abord, en ce qui concerne la durée du chauffage, il est dit dans le premier mémoire de Kjeldahl¹⁾ que deux ou trois heures suffiront ordinairement si l'on emploie un mélange d'acide sulfurique concentré et d'acide sulfurique fumant ou d'acide phosphorique anhydre, tandis que l'emploi de l'acide sulfurique anglais seul exige un chauffage prolongé pour que le liquide puisse devenir incolore ou presque incolore. Cependant, d'après l'expérience de Kjeldahl, il n'est point nécessaire — du moins en ce qui concerne les substances protéiques et leurs dérivés — de faire bouillir jusqu'à ce que le liquide soit devenu tout à fait incolore, et même si l'on emploie l'acide sulfurique anglais, les matières protéiques, après deux ou trois heures de chauffage, seront suffisamment décomposés pour que l'oxydation par le permanganate de potasse puisse s'effectuer sans perte d'azote. Quand il s'agit d'autres substances, où l'azote se trouve lié d'une autre manière qu'il ne l'est dans les matières protéiques, il faut, suivant Kjeldahl, prolonger le chauffage avec l'acide sulfurique anglais, ou bien se servir d'un mélange d'acide sulfurique et d'acide phosphorique anhydre. Comme on le sait, une série d'expériences minutieuses, faites surtout par des chimistes allemands, ont montré que l'addition de métaux ou d'oxydes métalliques (oxyde de cuivre, mercure, oxyde de mercure, ou mélanges de ces oxydes) exerce une influence fortement accélérante sur la réaction, bien qu'en aucune circonstance il ne soit recommandable de faire bouillir pendant moins d'une demi-heure. Par conséquent, il n'est point étonnant que Kutscher et Steudel soient arrivés à des résultats trop bas dans les expériences où la durée du chauffage varie de cinq minutes à une demi-heure et où, en outre, ils font souvent usage de l'acide sulfurique concentré seul, sans addition aucune. Si néanmoins dans un nombre très restreint de ces expériences, faites sur la créatine, ils

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. **2**, Résumé français, p. 5 (1883). Zeitschr. f. analyt. Chem. **22**, 372 (1883).

trouvent une teneur en azote se rapprochant de celle donnée par le calcul, on est amené à admettre des différences accidentelles survenues durant le chauffage; tout ce qu'on peut en conclure, c'est donc que la créatine est une substance très facile à analyser d'après la méthode de Kjeldahl. — On pourrait faire remarquer ici que dans les expériences très nombreuses faites dans le courant des années au laboratoire de Carlsberg d'après la méthode Kjeldahl, on a toujours pu constater qu'en réduisant le temps du chauffage à moins de deux ou trois heures, on s'expose à perdre de l'azote. Dans des expériences faites sur le lait et la bière, en se servant d'acide sulfurique, de mercure et d'oxyde cuivrique comme moyens de décomposition, il est arrivé parfois, avant que la décomposition fût réellement terminée, que le liquide a passé au vert pur, sans nuance brunâtre, — phénomène correspondant exactement à la façon dont se comportent les substances telles que la créatine, la créatinine et l'acide urique, lesquelles ne donnent point de coloration, ou tout au plus une teinte passagère, à l'acide sulfurique pendant le chauffage. D'autre part, il a été constaté maintes fois au laboratoire de Carlsberg que la réaction prend la marche voulue quand le liquide chauffé n'a que de l'acide sulfurique concentré sans autre addition qu'un peu d'oxyde cuivrique et que le chauffage est poussé — au moins pendant 3 heures¹⁾ — jusqu'à ce que le liquide soit devenu d'un vert pur sans teinte brunâtre. Somme toute, en effet, il importe naturellement peu, dans la majorité des cas, qu'il faille prolonger l'ébullition une heure de plus ou de moins, attendu que les ballons dans lesquels le chauffage se fait peuvent être abandonnés à eux-mêmes et sans aucune surveillance, pourvu qu'on ajoute un peu de cuproxyde seulement: c'est ainsi que même des substances très difficiles à décomposer se prêtent à la décomposition par une faible ébullition du jour au lendemain.

En ce qui concerne l'oxydation par le permanganate de potasse, divers chimistes ont admis que, pourvu que la décomposition par l'acide sulfurique soit effectuée comme il faut et qu'on la mène à bout, il est superflu d'ajouter le permanganate de potasse, et que cette addition peut même être préjudiciable

¹⁾ Il va de soi que dans des cas spéciaux on peut faire des exceptions à cette règle, lorsqu'en examinant des espèces particulières de substances on a pu constater qu'un aussi long chauffage n'est pas nécessaire.

en causant une perte d'azote. — A ce propos, on remarquera qu'il est naturellement inutile d'oxyder par le permanganate de potasse, s'il n'y a pas de substance organique qui se laisse oxyder ultérieurement, et souvent il en sera ainsi lorsque l'ébullition aura un peu dépassé le moment où le liquide passe au vert pur; mais il peut arriver aussi que la décomposition ne soit pas absolument achevée même après la coloration en vert, et dans ce cas l'emploi du permanganate de potasse s'impose. Il va sans dire qu'il en est de même dans toute analyse où le chauffage est interrompu avant que le liquide se soit teint en vert pur. Comme il peut conséquemment se produire des cas où l'utilisation du permanganate de potasse soit désirable, nous en faisons usage ici au laboratoire de Carlsberg dans tous les dosages d'azote d'après la méthode Kjeldahl, l'oxydation par le permanganate de potasse employé de la manière indiquée par Kjeldahl¹⁾ n'occasionnant jamais de perte d'ammoniaque. D'autre part, il n'est pas praticable d'imiter Kutscher & Steudel en ajoutant le permanganate au liquide refroidi et de le porter ensuite à l'ébullition; car alors une perte d'azote est pour ainsi dire inévitable. Aussi, dans son premier mémoire Kjeldahl en dissuade expressément dans ces termes²⁾:

»Mais il faut bien se garder, après que la couleur verte a apparu, de chauffer de nouveau fortement le liquide. En effet, il se produit alors une réduction avec formation d'un sel de protoxyde de manganèse et grand dégagement d'oxygène, et le liquide redevient clair, changement que j'ai souvent eu l'occasion de voir accompagné d'une perte sensible d'ammoniaque.«

Dans ce qui précède nous voyons une preuve péremptoire que, par la méthode par eux employée, Kutscher & Steudel n'ont point pu obtenir des résultats exacts, ni même concordants. Néanmoins, vu l'importance de la question, nous avons trouvé nécessaire de vérifier l'applicabilité de la méthode Kjeldahl vis-à-vis des substances étudiées par Kutscher & Steudel. Nous profitons de cette occasion pour donner une description sommaire de la manière dont le laboratoire de Carlsberg applique la méthode Kjeldahl et que nous avons suivie dans ce cas aussi. C'est essentiellement le même procédé que celui recom-

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. **2**, Rés. franç. p. 6 (1883); Zeitschr. f. analyt. Chem. **22**, 374 (1883).

²⁾ Carlsb. Lab. Medd. **2**, Rés. franç. p. 7 (1883).

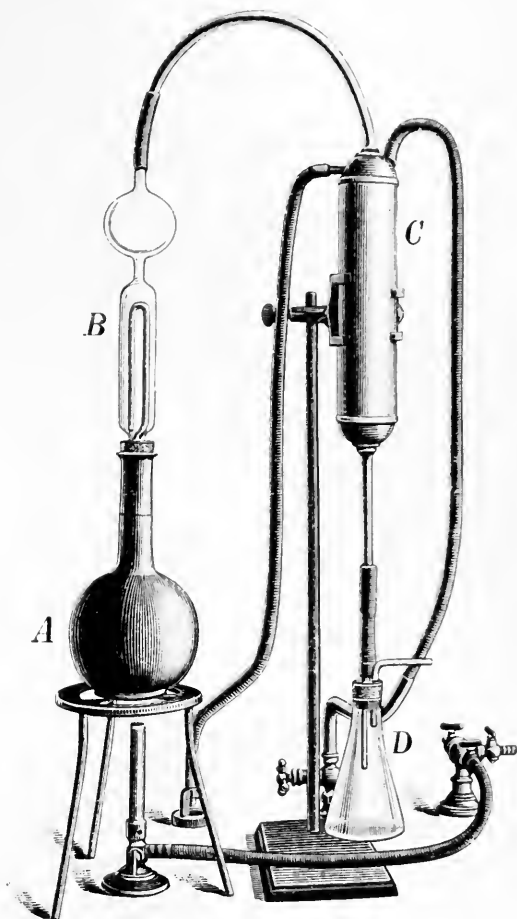
mandé par Kjeldahl dans son premier mémoire. En conséquence, comme Kjeldahl l'avait déjà fait ressortir, il n'est pas applicable à l'analyse des alcaloïdes, ni à celle de toute matière azotée exigeant un traitement préparatoire avant le chauffage avec l'acide sulfurique (combinaisons nitrées etc.).

Dans un matras en verre d'Iéna à fond plat, à long col et de la capacité de 100 cc., on pèse une quantité telle de la matière à analyser que l'azote qu'elle renferme donne un total de 15 à 30 mgr.; toutefois, la quantité pesée doit préférablement ne pas excéder 0^{gr},4. De plus, pour les combinaisons très pauvres en azote et pour lesquelles, conséquemment, il est désirable d'opérer sur 1 gr., ou à peu près, de substance, il convient d'employer le double de la quantité ci-dessous indiquée d'acide sulfurique. S'il s'agit d'analyser une solution, on en enlève au moyen d'une pipette un volume convenable. Après addition de 1/2 ou 1 cc. d'acide sulfurique, on réduit à un petit volume, par évaporation dans le matras de décomposition, soit sur une toile métallique au-dessus d'une petite flamme, soit — si cela présente des difficultés (en secouant ou écumant) — dans un séchoir à une température convenable. Ensuite, on procède de la même façon que pour l'analyse des substances solides. Après addition de 10 cc. d'acide sulfurique concentré et d'une dose minime (0^{gr},05 à 0^{gr},1) d'oxyde cuivrique, on place le matras sur une petite toile métallique, au-dessus d'un bec d'Argand. Cette toile métallique est revêtue d'amiante, où est ménagée une petite découpure circulaire qui permet au matras de reposer directement sur la toile métallique, en même temps qu'il est protégé contre la radiation de la lampe. On fait pencher le matras, de manière que le col repose sur un support, afin d'empêcher les éclaboussures pendant le chauffage. — D'abord on chauffe très faiblement, et l'on agite à plusieurs reprises le contenu du matras jusqu'à ce que le tout soit entré en dissolution et que le liquide, qui aura alors ordinairement pris une couleur foncée, ait presque atteint le point d'ébullition. Ensuite, c'est-à-dire, au bout de 10 à 15 minutes, on chauffe davantage, jusqu'à ce que le liquide commence à bouillir, après quoi l'on peut régler la lampe Argand de manière à permettre au contenu du matras de bouillir légèrement. Après cela, le matras ne demande ordinairement pas de surveillance ultérieure et peut rester en repos jusqu'à ce que le contenu ait pris une coloration vert pur sans nuance brunâtre,

ce qui prend des temps très différents, parce que cela dépend tant de la nature que de la quantité de la substance traitée ; il ne faut pourtant jamais faire bouillir pendant moins de 3 heures, même quand le liquide aurait pris la coloration verte avant l'expiration de ce terme. (Voir la remarque à la page 128).

Après avoir fait bouillir suffisamment l'acide sulfurique, on enlève le matras et le place sur une assiette couverte de papier filtre. Puis, on oxyde aussitôt avec du permanganate de potasse sec et grossièrement pulvérisé, qu'on sème à la spatule dans le matras jusqu'à ce que, agitant la matière, on la voie se teindre en vert foncé sale grâce aux combinaisons manganésiques produites. Après repos et refroidissement, on ajoute de l'eau distillée, ce qui produit naturellement une élévation de température, de sorte qu'il faut encore refroidir le matras avant d'entreprendre la distillation en présence de lessive de soude.

La figure ci-contre montre l'appareil distillatoire. *A* est un matras en cuivre sans autres soudures que celle qu'on peut voir au col du matras dans le dessin. Dans ce matras on verse le mélange à distiller. On rince le ballon en verre par environ $\frac{1}{4}$ l. d'eau. Puis on ajoute 60 cc. de lessive de soude à 30%, et place le matras en cuivre aussi vite que possible dans la position montrée dans la figure. Alors on distille (sans addition de zinc), en retenant à l'aide de l'appareil laveur *B* la petite quantité de soude entraînée. L'appareil refroidisseur se compose d'un tube d'étain droit chemisé de cuivre, et le récipient, qui renferme 15 cc. d'acide sulfurique normal à env. $\frac{1}{7}$, est un ballon ordinaire de la capacité de $\frac{1}{4}$ l. et qui porte une marque gravée



indiquant le volume 100 cc. On interrompt la distillation lorsque le volume du produit distillé a atteint 100 cc., ce qui demande moins de 10 minutes.

Le titrage s'effectue par la méthode ordinaire de dosage iodométrique des acides. On se sert d'une solution d'hyposulfite de soude norm. au $\frac{1}{14}$ ($\frac{1}{14,04}$).

Pour cette méthode extrêmement rapide et pourtant très exacte, nous renvoyons les lecteurs aux communications de Kjeldahl¹⁾, où l'on trouvera une description complète tant de son exécution que de la préparation et la conservation de la solution employée d'hyposulfite. De temps en temps — et surtout chaque fois qu'on se sert de nouveaux réactifs (acide sulfurique concentré ou lessive de soude) — on fait des essais témoins dans lesquels 0^{gr},5 de sucre de canne pur est traité d'une manière identique à celle dont se fait une analyse réelle. — Le calcul est extrêmement simple: Si dans l'essai témoin les 15 cc. d'acide sulfurique norm. à env. $\frac{1}{7}$ exigent a cc. de solution d'hyposulfite, tandis qu'une analyse réelle n'en demande que b cc., il s'ensuit que la quantité pesée de l'analyse a renfermé $a \div b$ mgr. d'azote.

Voilà comment ont été effectués tous les dosages ci-après indiqués, sauf la variété de la durée de l'ébullition (pour chaque essai, on trouvera des indications précises à ce sujet).

1. Créatine.

On a employé une créatine (puriss. cryst. Schuchardt, Goerlitz) qui, desséchée dans le vide à une température de 95° jusqu'à réduction à un poids constant, n'a perdu que 9,82% d'eau, tandis que le calcul en demande pour une molécule d'eau de cristallisation 12,07%.

En douze heures, 1^{gr},5229 perdirent 0^{gr},1496 dans le vide à une température de 95°, mais plus rien quand on poursuivit la dessiccation.

Pour une teneur en eau de 9,82%, la créatine contient
28,95% d'azote.

Par la méthode de Dumas on a trouvé 28,98% —

— Kjeldahl — 28,79% — (28,65 à 28,94).

0^{gr},1268 ont donné 32^{cc},40 d'azote, mesuré à 18° et sous une pression de 750 mm.

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. **2**, Résumé franç. p. 9 (1883), et **2**, Res. franç. p. 193 (1888); Zeitschr. f. analyt. Chem. **22**, 378 (1883), et **31**, 451 (1892).

Dosages par la méthode Kjeldahl.

Nos des essais	Quantités pesées de substance, en gr.	Volumes (en cc.) d'hypo- sulfite cor- respondant aux quan- tités d'am- moniaque	Teneurs en azote ‰	Remarques
1	0,0907	26,05	28,72	{ Faible chauffage, sans ébullition, la nuit durant ; puis légère ébullition pendant quatre heures.
2	0,0989	28,60	28,92	{ Additionné de 0 ^{gr} ,1 de sucre de canne ¹ ; chauffé et bouilli comme N° 1.
3	0,0830	23,80	28,68	Comme N° 2.
4	0,0988	28,40	28,74	{ Additionné de 0 ^{gr} ,2 de sucre de canne ; chauffé et bouilli comme N° 1.
5	0,0806	23,30	28,91	Comme N° 2.
6	0,0800	23,00	28,75	{ Ajouté 0 ^{gr} ,1 de sucre de canne. Amené en cinq minutes à l'ébullition, puis bouilli pendant une heure, le liquide ayant alors pris la colo- ration verte sans teinte brunâtre.
7	0,0890	25,50	28,65	Comme N° 6, bouilli pendant 2 heures.
8	0,0915	26,35	28,80	— - 6, — — 3 —
9	0,0945	27,35	28,94	Comme N° 1, c'est-à-dire, sans sucre de canne.
		Moyenne: 28,79		

Il ressort de quelques-unes de ces expériences (N^{os} 6—8) que la créatine est du nombre des substances qui, bouillies avec l'acide sulfurique concentré, perdent facilement et vite leur azote sous forme d'ammoniaque.

2. Créatinine.

Dans ces expériences on a employé une créatinine impure (Merck). Tandis que le calcul avait assigné à la créatinine pure une teneur en azote de

37,21 ‰,

on a trouvé par la méthode de Dumas

34,39 ‰

— — — — — Kjeldahl 34,09 ‰ (33,81 à 34,35).

0^{gr},1130 ont donné 34^{cc},0 d'azote, mesuré à 18⁰,9 et sous une pression de 759 mm.

¹) Pour les substances qui, comme la créatine, sont solubles dans l'acide sulfurique concentré et que l'on peut faire bouillir dans cet acide sans qu'elles se carbonisent, il est souvent pratique d'ajouter une petite dose d'une substance organique non azotée, telle que le sucre de canne, qui par ébullition avec l'acide sulfurique donne une forte carbonisation. Alors, si l'on fait bouillir jusqu'à ce que le liquide ait verdi sans brunir, on a — de même que ceci est le cas pour les corps azotés qui, chauffés avec l'acide sulfurique, se carbonisent — un signe visible que la décomposition peut être considérée comme achevée.

Dosages par la méthode Kjeldahl.

Nos des essais	Quantités pesées de substance, en gr.	Volumes (en cc.) d'hypo- sulfite cor- respondant aux quan- tités d'am- moniaque	Teneurs en azote ‰	Remarques
10	0,1155	39,35	34,07	Comme N° 1, c'est-à-dire, sans sucre de canne.
11	0,0673	22,95	34,10	— . 2, — avec 0 ^{gr} ,1 de sucre de canne
12	0,0614	20,95	34,12	— . 2, — • —
13	0,0674	23,15	34,35	— . 2, — —
14	0,0675	23,00	34,07	— . 1
15	0,0695	23,50	33,81	— . 2
		Moyenne : 34,09		

3. Acide urique.

On a employé de l'acide urique, dont la teneur calculée en azote est de 33,39‰

Par la méthode de Dumas on a trouvé 33,48‰

— Kjeldahl — 33,33‰ (33,30 à 33,35).

0^{gr},1220 ont donné 35^{cc},80 d'azote, mesuré à 18^o,4 et sous 756 mm. de pression.

Dosages d'après Kjeldahl.

N° 16. 0^{gr},0907 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 30^{cc},20 de solution d'hyposulfite (33,30‰ d'azote) (bouilli comme N° 1).

N° 17. 0^{gr},0967 répondaient à 32^{cc},25 de solution d'hyposulfite (33,35‰ d'azote) (bouilli comme N° 2).

4. Combinaisons de lysine.

Quant aux combinaisons pures de lysine — obtenues par la décomposition de substances protéiques —, nous n'avons eu l'occasion d'analyser qu'une seule, à savoir la combinaison hydantoïnique préparée par le procédé de Herzog¹⁾ à l'aide de l'isocyanate de phényle et dont la teneur théorique en azote est de 15,33‰.

Par la méthode de Kjeldahl nous avons trouvé 15,23‰.

N° 18. 0^{gr},1363 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 20^{cc},76 d'hyposulfite (15,23‰ d'azote) (bouilli lentement en une nuit jusqu'à obtention du vert sans brun).

D'un autre côté, nous avons examiné d'assez nombreuses

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 525 (1902).

combinaisons préparées par voie synthétique et qui, bouillies avec l'acide sulfurique concentré, se comporteront certainement tout comme la lysine naturelle. Ainsi, il y a quelque temps, l'un de nous¹⁾ a décrit une série de combinaisons dérivées de l'acide α - δ -diaminovalérique et dont l'azote pouvait facilement être dosé par la méthode Kjeldahl. Pareillement, nous avons fait l'examen de quelques composés dérivés de l'acide racémique α - ε -diaminocaproïque («lysine rac.») que nous avons également préparé par voie synthétique²⁾.

Pour les expériences effectuées en premier lieu, nous nous sommes servis d'un »chlorure rac. de lysine« à l'état brut. Tandis que le calcul avait donné pour les teneurs en chlore et en azote respectivement 32,35 % et 12,81 %, nous n'avons trouvé que 30,89 % de chlore et

d'après Dumas 12,63 % d'azote
— Kjeldahl 12,52 % — (12,43 à 12,61).

0 gr,2260, titrés avec du nitrate d'argent en excès, puis filtrés et retitrés avec une solution de rhodanure d'ammonium, ont demandé 19 cc,52 d'une solution de nitrate d'argent norm. à env. $\frac{1}{10}$ (1 cc. ∞ 3 mgr,576 de chlore), correspondant à 30,89 % de chlore.

0 gr,3137 donnèrent 34 cc,60 d'azote, mesuré à 18°,2 et sous une pression de 758 mm. (12,63 % d'azote).

N° 19. 0 gr,1914 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 24 cc,13 d'hyposulfite (12,61 % d'azote (bouilli comme N° 1).

N° 20. 0 gr,2055 répondaient à 25 cc,55 d'hyposulfite (12,43 % d'azote). (Ayant chassé l'acide chlorhydrique à l'aide d'acide sulfurique dilué, nous avons ajouté de l'acide sulfurique concentré, et fait bouillir de la même manière que pour N° 1).

Les combinaisons de lysine sont, en effet, du nombre des substances qui, par ébullition avec l'acide sulfurique conc., abandonnent assez difficilement tout leur azote sous forme d'ammoniaque. Nous nous en sommes convaincus par deux expériences où la durée de l'ébullition a été réduite à 2 heures; une addition d'acide phosphotungstique n'y a rien changé³⁾.

N° 21. 0 gr,1773 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 21, cc75 d'hyposulfite (12,27 % d'azote). (Après 1 $\frac{3}{4}$ heure

¹⁾ S. P. L. Sørensen, Comptes-rendus du Labor. de Carlsb., Vol. 6, p. 32 (1903).

²⁾ Quant à la préparation de l'acide α ε -diaminocaproïque racémique, on trouvera des renseignements provisoires à ce sujet dans le chapitre qui termine le mémoire qu'on vient de citer (page 60).

³⁾ Conférez Henderson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 322 (1900).

d'ébullition, le liquide était d'un vert exempt de brun; l'ébullition n'a duré que 2 heures en tout).

N° 22. 0^{gr},1771 répondaient à 21^{cc},70 d'hyposulfite (12,25⁰/₀ d'azote). (On avait ajouté 3 cc. d'une solution phosphotungstique aqueuse à 50⁰/₀, et la durée totale de ébullition n'était que de 2 heures).

Après une recristallisation convenable, le »chlorure racémique de lysine« s'est trouvé pur.

Trouvé: 32,08⁰/₀ de chlore et 12,74⁰/₀ d'azote.

Calculé: 32,35⁰/₀ — — 12,81⁰/₀ —

0^{gr},1438 demandaient, au titrage fait comme ci-dessus, 12^{cc},90 de la solution susmentionnée de nitrate d'argent, correspondant à 32,08⁰/₀ de chlore.

N° 23. 0^{gr},1925 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 24^{cc},52 d'hyposulfite (12,74⁰/₀ d'azote). (Après deux heures d'ébullition, la solution était d'un vert pur sans brun; puis, on a continué l'ébullition pendant trois heures).

En partant du chlorure non recristallisé de lysine, nous avons préparé, par le procédé de Herzog¹⁾, la combinaison de phénylisocyanate de lysine et ensuite le composé hydantoinique; la teneur en azote de ce dernier déterminée par la méthode Kjeldahl était de 15,18⁰/₀, la théorie ayant donné 15,33⁰/₀.

N° 24. 0^{gr},1507 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 22^{cc},87 d'hyposulfite (15,18⁰/₀ d'azote) (en faisant bouillir légèrement pendant la nuit, jusqu'à coloration en vert pur).

Les expériences qu'on vient de décrire ont pour résultat que la méthode de Kjeldahl s'adapte très bien à l'analyse des composés dont il s'agit ici; dans le cas présent comme d'habitude, la méthode Kjeldahl donne des résultats trop faibles d'une quantité à peu près inappréciable, de même que ceux de la méthode Dumas pèchent par un très léger excès.

¹⁾ Voir l'endroit cité.

ÉTUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS

PAR

S. P. L. SØRENSEN.

V. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.

Jusqu'à ces dernières années, la sérine était le seul représentant connu du groupe des acides oxyaminés, groupe appartenant aux produits de dédoublement des substances protéiques; encore n'en avait-on démontré l'existence que par la décomposition d'une seule substance, savoir la séricine¹⁾. Les recherches faites ces dernières années ont modifié cet état de choses d'une manière essentielle. C'est ainsi que E. Fischer et ses collaborateurs sont parvenus à révéler l'existence de la sérine parmi les produits de dédoublement des substances protéiques les plus diverses, notamment la fibroïne²⁾, la corne³⁾, l'oxyhémoglobine⁴⁾, la sérum-albumine⁵⁾, l'édestine⁶⁾, la caséine⁷⁾ et la gélatine⁸⁾. Kossel et Dakin⁹⁾ avaient même trouvé la sérine dans les moins complexes des substances protéiques jusqu'ici connues: les protamines salmine et clupéine. Parmi les produits de dédoublement, on a rencontré également de nouveaux acides oxyaminés. C'est ainsi que E. Fischer a découvert, d'abord

¹⁾ Cramer: Journ. prakt. Chemie 96, 76 (1865).

²⁾ Emil Fischer et Aladar Skita: Zeitschr. physiol. Ch. 35, 221 (1902).

³⁾ Emil Fischer et Th. Dörpinghaus: *ibid.* 36, 462 (1902).

⁴⁾ Emil Abderhalden: *ibid.* 37, 484 (1903).

⁵⁾ Emil Abderhalden: *ibid.* 37, 495 (1903).

⁶⁾ Emil Abderhalden: *ibid.* 37, 499 (1903).

⁷⁾ Emil Fischer: *ibid.* 39, 155 (1903).

⁸⁾ Emil Fischer et Emil Abderhalden: *ibid.* 42, 543 (1904).

⁹⁾ *Ibid.* 40, 312 et 565 (1903).

dans la colle¹⁾ et plus tard dans la caséine²⁾, l'acide α -pyrrolidinecarbonique trouvé par Emil Abderhalden³⁾, d'après le procédé de Fischer, dans l'oxyhémoglobine et l'édestine. A. Orgler et C. Neuberg⁴⁾ ont signalé un acide tétraoxyaminocaproïque parmi les produits de dédoublement de la chondrosine, et enfin, l'année qui vient de s'écouler, plusieurs chimistes ont déclaré avoir trouvé, parmi les produits de décomposition de substances protéiques, des oxyacides aminés, ordinairement de constitution inconnue et dérivés d'acides assez riches en carbone. C'est ainsi que Zd. H. Skraup⁵⁾ croit avoir obtenu par hydrolyse de la caséine avec l'acide chlorhydrique, entre autres produits, les acides suivants: l'acide oxyaminosuccinique, l'acide dioxydiamino-subérique, un acide »caséanique«, $C_9H_{16}N_2O_7$, qu'on doit vraisemblablement considérer comme un oxyacide diaminé tri-basique, et enfin un acide »caséinique« $C_{12}H_{24}N_2O_5$, qui se présentait sous deux modifications différentes et qui était probablement un oxyacide diaminé bibasique. Par hydrolyse de la caséine également, mais avec l'aide de l'acide sulfurique, E. Fischer et E. Abderhalden⁶⁾ ont préparé un acide, $C_{12}H_{26}N_2O_5$, qu'ils supposent être de l'acide diaminotrioxydecylique. Enfin J. Wohlgemuth⁷⁾ pense avoir trouvé, par hydrolyse de la nucléoprotéide du foie, les acides oxyaminosubérique et oxydiaminosébacique. Cependant, la découverte des acides oxyaminés assez nombreux, que nous venons d'énumérer, parmi les produits de dédoublement des substances protéiques, ainsi que la fréquence dans la molécule protéique de la sérine (terme initial et de constitution la plus simple du groupe des oxyacides aminés), laissent présumer que lesdits produits de dédoublement pourraient bien, outre les acides oxyaminés mentionnés ci-dessus, en comprendre d'autres plus rapprochés de la sérine. C'est ce qui me fait croire à l'importance d'une méthode pour la préparation synthétique des acides oxyaminés analogues à la sérine, et dans ce qui va suivre, on trouvera une description

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 2660 et 3785 (1902).

²⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 39, 155 (1903).

³⁾ Ibid. 37, 484 et 499 (1903).

⁴⁾ Ibid. 37, 418 (1903).

⁵⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1596 (1904) et Zeitschr. physiol. Ch. 42, 274 (1904).

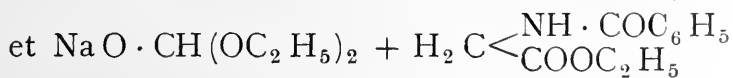
⁶⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 42, 540 (1904).

⁷⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 4362 (1904).

détaillée d'une telle méthode, précédée d'un aperçu sommaire des synthèses les plus importantes des acides oxyaminés antérieurement publiés.

En employant la réaction Strecker bien connue, c'est-à-dire une addition d'ammoniaque et d'acide cyanhydrique à un aldéhyde, puis une transformation du groupe nitrile en carboxyle, E. Fischer et H. Leuchs¹⁾ ont préparé la sérine synthétiquement en partant de l'aldéhyde glycolique. En même temps, à partir de l'acide β -chlorolactique et de l'ammoniaque, ils ont préparé l'isosérine, et par réduction de cette dernière et de la sérine au moyen d'acide iodhydrique, ils ont obtenu et l'acide α - et l'acide β -aminopropionique, de sorte qu'on peut dès maintenant considérer comme établie la constitution de la sérine aussi bien que celle de l'isosérine. Dans la préparation de la sérine avec l'aldéhyde glycolique, le rendement fut peu considérable (9 % de la théorie); mais avec d'autres aldéhydes la méthode a donné de meilleurs résultats: c'est ainsi qu'avec l'aldol ils ont obtenu l'acide α -amino- γ -oxyvalérique (rendement 30 %); avec la galactose, l'acide galaheptosamique (rendement 20 à 25 %); avec l'arabinose g. et plus tard²⁾ avec l'arabinose dr., les importants acides glucosamiques g. et dr. (rendement env. 10 %); le dernier a pu être réduit en glucosamine dr., déjà connue comme un produit de dédoublement, plus particulièrement des glucoprotéides. Par un procédé semblable, c'est-à-dire en traitant de la glucosamine dr. par de l'acide cyanhydrique, C. Neuberg et H. Wolff³⁾ ont préparé les deux acides β -aminoglucoheptosamiques dr. qu'on peut obtenir par ce procédé.

Par un procédé différent du précédent, on a également réalisé la synthèse de la sérine. Par condensation de l'éther formique et de l'éther hippurique avec l'éthylate de sodium, E. Erlenmeyer jeune et F. Stoop⁴⁾ ont obtenu le sel de sodium de l'éther oxyméthylènehippurique:



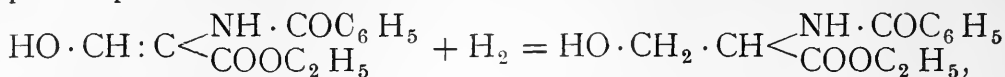
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 3787 (1902).

²⁾ Ibid. 36, 24 (1903).

³⁾ Ibid. 35, 4018 (1902) et 36, 618 (1903).

⁴⁾ Ibid. 35, 3769 (1902).

L'éther oxyméthylènehippurique libre fut réduit en solution étherée par l'amalgame d'aluminium en présence d'eau ajoutée peu à peu :



L'éther benzoylsérique obtenu, chauffé avec l'acide sulfurique étendu, a donné de la sérine.

Enfin A. Ellinger¹⁾ et, indépendamment de lui, C. Neuberger et M. Silbermann²⁾ ont cherché en même temps à préparer la sérine avec de l'acide diaminopropionique en faisant agir sur le sel chlorhydrique ou bromhydrique (de l'acide diaminopropionique) la quantité de nitrite d'argent correspondante à l'un des deux groupes aminés; mais cette réaction a toujours donné de l'isosérine (rendement 50 % de la théorie). Dans son mémoire Ellinger dit qu'il a l'intention de continuer ces essais en partant de l'ornithine et de la lysine; on verra alors si même dans ces cas l'acide nitreux porte exclusivement sur le groupement aminé en position α , ce qui vraisemblablement rendrait impossible l'obtention par ce procédé des oxyacides α -aminés.

La méthode employée par moi contraste avec celle que je viens d'exposer, en ce sens qu'à l'instar de mes synthèses antérieures des acides aminés³⁾ je me suis adressé à l'éther phtalimidomalonique, qui ne peut fournir que des composés α -aminés. L'acide aminé dont la préparation et les propriétés font l'objet du présent mémoire, est l'acide α -amino- δ -oxyvalérique. Cet acide me parut offrir un intérêt tout particulier, en raison des faits suivants: En premier lieu, il contient cinq atomes de carbone liés en série, phénomène que l'on retrouve chez quelques-uns des plus importants produits de décomposition des protéines (la leucine, l'acide glutamique, l'arginine et l'acide pyrrolidine- α -carbonique); en second lieu, je croyais possible de trouver dans cet acide oxyaminé la substance mère de l'acide pyrrolidine- α -carbonique qui, d'après les recherches de E. Fischer, se rencontre constamment parmi les produits de dédoublement des protéines. Il est vrai que les travaux très intéressants de E. Fischer et E. Abderhalden⁴⁾ ont démontré que l'acide pyr-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 335 (1904).

²⁾ ibid. 37, 341 (1904).

³⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 1 (1902).

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 39, 81 (1903) et 40, 215 (1903).

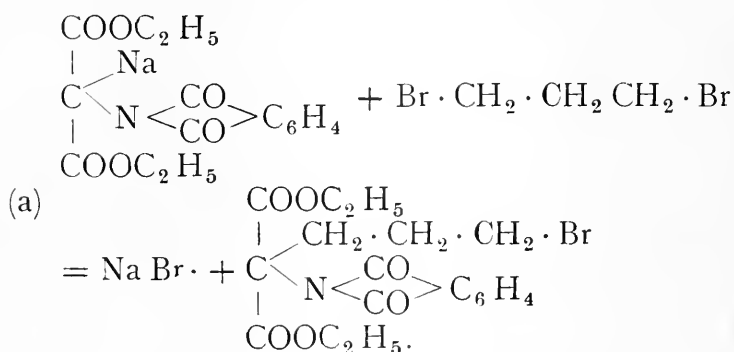
rolidine- α -carbonique peut se rencontrer entre les produits de dédoublement de la caséine, même si l'on a évité tout traitement par des acides ou des alcalis forts; mais même par l'action combinée de la pepsine plus de l'acide chlorhydrique et de la pancréatine les auteurs n'ont pu obtenir plus d'une partie de la quantité d'acide pyrrolidine- α -carbonique que fournit la caséine dans un dédoublement ordinaire avec un acide. Sans doute une partie de l'acide pyrrolidine- α -carbonique se trouve dans le »polypeptide« restant non digéré et en petite quantité, après un traitement par la pepsine et par la trypsine. E. Fischer et E. Abderhalden ne disent pas quelle quantité de »polypeptide« ils ont trouvée dans leurs expériences susmentionnées; mais des expériences de digestion de la caséine exécutées de la même manière, quoique dans une autre intention, soit avec de la pancréatine seule, soit avec de la pepsine et ensuite avec de la pancréatine, ont donné à E. Abderhalden et P. Rona¹⁾ une teneur en »polypeptide« indigeste de 15 % dans le premier cas, tandis que dans le second elle était de 8 % seulement du poids de la caséine. C'est pourquoi il me semble qu'on n'a pas encore résolu d'une manière satisfaisante cette question très importante: si, oui ou non, l'acide pyrrolidine- α -carbonique est un produit primaire de dédoublement. Il ne découle pas de ces faits que l'acide pyrrolidine- α -carbonique soit contenu comme tel dans la molécule protéique; au contraire, on peut les expliquer en admettant la supposition faite par Fischer dans le premier de tous ses mémoires sur ce sujet, à savoir que ledit acide est un produit secondaire provenant d'une fermeture de la chaîne d'un dérivé 1.4 de l'acide valérique²⁾. Évidemment cette fermeture se produit sur une plus grande échelle par dédoublement avec de l'acide chlorhydrique fort que par scission d'enzymes. Ainsi qu'il ressort de ce qui va suivre, l'évaporation avec de l'acide chlorhydrique convertit l'acide α -amino- δ -oxyvalérique en acide pyrrolidine- α -carbonique, non intégralement, il est vrai, mais en quantité considérable. Par conséquent, il se pourrait qu'un groupement de ce genre faisant partie de la molécule protéique fût la substance mère de l'acide pyrrolidine- α -carbonique; mais il va de soi qu'il faut alors établir la présence de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique parmi les produits de dédouble-

¹⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 42, 528 (1904).

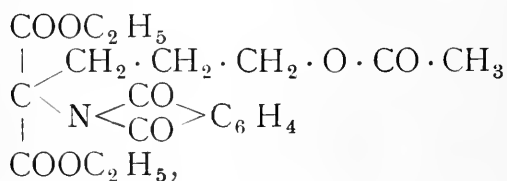
²⁾ ibid. 33, 169 (1901).

ment si l'on veut arriver à quelque chose de plus qu'une simple hypothèse. Dans le but d'éclaircir cette question, M. Jessen-Hansen vient d'ailleurs de commencer des expériences dans notre laboratoire.

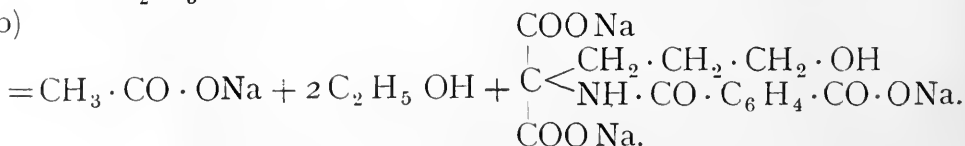
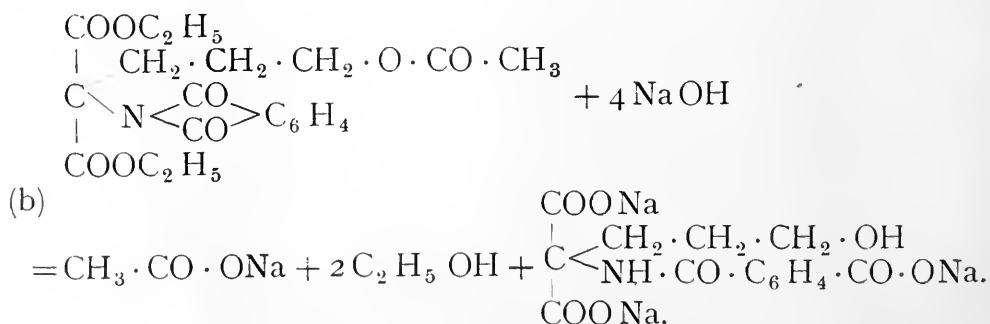
La préparation de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique à partir de l'éther phtalimidomalonique se rattache étroitement aux synthèses que j'ai décrites dans un mémoire antérieur. En traitant de l'éther phtalimido-sodomalonique par un grand excès de bromure de triméthylène, il se forme de l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique, qu'on débarrasse de l'excès de bromure de triméthylène par distillation à vapeur d'eau. La dérivé bromopropylique ainsi formé est transformé par ébullition avec de l'acétate de potassium en acétate correspondant qui, traité par une lessive de soude, puis évaporé en présence de l'acide chlorhydrique, fournit le sel chlorhydrique de l'acide oxyaminé cherché. Les réactions auxquelles ces opérations donnent lieu sont les suivantes:



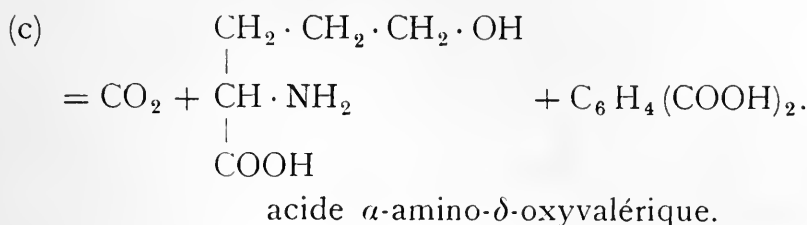
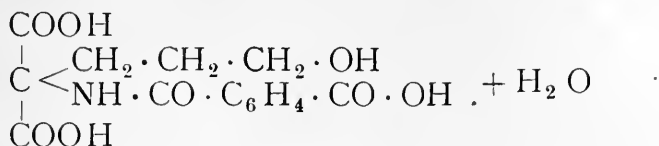
Traité par l'acétate de potassium, ce dernier composé donne du bromure de potassium et le dérivé acétique



qui, chauffé avec de l'hydroxyde de sodium, se décompose comme suit:

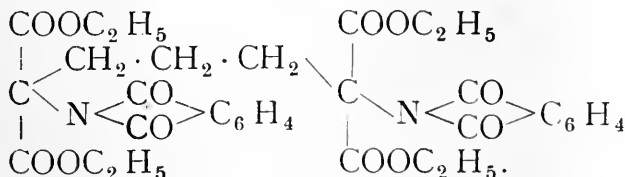


L'acide correspondant à ce sel sodique, se décompose à l'évaporation avec de l'acide chlorhydrique, comme suit :



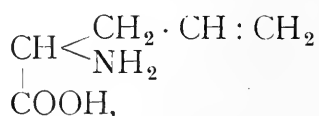
Reléguant aux parties suivantes du présent mémoire les détails de cette méthode, je vais faire ici quelques remarques se rapportant surtout à la marche plus ou moins complète de ces réactions.

Le rendement en éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique était d'environ 75 % de la théorie, de sorte que la réaction suivant l'équation (a) n'est pas tout à fait quantitative. Je n'ai pas réussi à séparer le bromure d'avec le produit accessoire formé en même temps: j'ai dû me servir, sans le purifier, du mélange obtenu, une espèce d'huile jaunâtre, qui m'a servi de point de départ pour les réactions suivantes. C'est pourquoi il était important pour moi d'établir la nature du produit accessoire, ou plutôt des produits auxquels il avait donné naissance dans un traitement à la lessive de soude et à l'acide chlorhydrique, produits qui se présentaient sous forme d'impuretés souillant l'acide α -amino- δ -oxyvalérique brut. Dans une réaction comme celle qu'exprime l'équation (a) on devrait s'attendre à obtenir comme produit accessoire une combinaison dans laquelle les deux atomes de brome du bromure de triméthylène fussent remplacés par le reste de l'éther phthalimidomalonique :



Comme on le voit facilement, cette combinaison dédoublée au moyen de l'hydroxyde de sodium et de l'acide chlorhydrique (comp. les équations (b) et (c)) donnerait de l'acide α - ε -diamino-

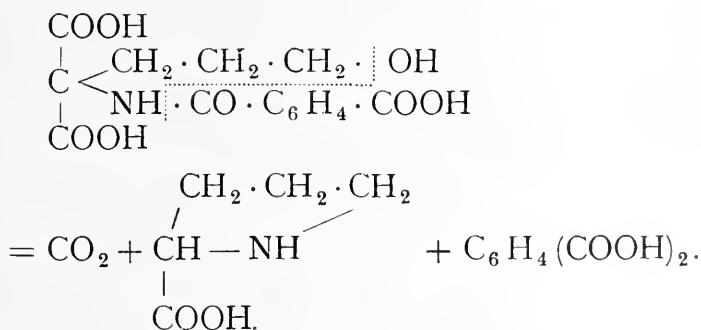
pimélique (voir aussi p. 147); mais cet acide, dont il est facile de reconnaître la présence, parce qu'il fournit un sel cuivrique presque insoluble, ne se trouve dans l'acide oxyaminé brut qu'en proportions très minimes (v. p. 160). D'un autre côté, on a pu reconnaître dans ce dernier de la glycolle, dont la formation s'explique le mieux en admettant un contenu d'éther phtalimidomalonique inaltéré ou régénéré dans l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique. En effet, il ne serait pas étrange que l'éther phtalimido-sodomalonique, chauffé jusqu'à 160°—170° en présence du bromure de triméthylène, pût enlever à ce dernier du bromure d'hydrogène en donnant naissance à du bromure de sodium, de l'éther phtalimidomalonique libre et du bromure d'allyle, ou (au cas où deux molécules de bromure d'hydrogène seraient enlevées) de l'allylène symétrique. Cependant on a pu constater que dans cette réaction il n'y a pas eu dégagement de gaz, du moins pas en quantité suffisante pour expliquer la marche anormale de la réaction, de même qu'on n'a pu reconnaître la formation de bromure d'allyle qu'en proportions minimes. Sans doute on pourrait se figurer le bromure d'allyle réagissant avec une autre quantité d'éther phtalimido-sodomalonique, ou bien ce dernier enlevant le bromure d'hydrogène de l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique déjà formé, dans les deux cas avec formation d'éther allyle-phtalimidomalonique qui, par décomposition avec de l'hydroxyde de sodium et de l'acide chlorhydrique, fournirait de la glycolle allylique:



mais ce composé, aussi facile à déceler (v. p. 186), ne se trouve pas non plus dans l'oxyacide aminé brut. Par conséquent, on a pu seulement établir ce fait que la masse principale du produit accessoire formé en même temps que l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique est de constitution telle qu'une scission ultérieure donne de la glycolle. Même si le rendement en bromure (env. 75 %) doit être considéré comme très satisfaisant dans la préparation d'une substance organique, cette particularité qu'on n'a pu séparer le bromure d'avec l'impureté qui le souillait, a pour conséquence que la glycolle, à laquelle cette dernière donne naissance, crée plus tard des difficultés dans la pré-

paration de l'oxyacide aminé pur. Comme on verra plus loin dans la description détaillée de la purification de l'acide oxyaminé brut, on est parvenu, sans beaucoup de difficultés, à surmonter ces obstacles par la préparation du sel de cuivre de l'acide.

Pour ce qui concerne la seconde partie de la réaction, soit le traitement du bromure par l'acétate de potassium, avec décomposition subséquente du produit formé avec de l'hydroxyde de sodium et de l'acide chlorhydrique, il est à remarquer qu'elle n'est pas tout à fait quantitative ni elle non plus; car 15—20% de l'acide oxyaminé cherché se convertit en acide pyrrolidine- α -carbonique. Maintenant la question est de savoir à quel stade de la réaction cette formation d'acide pyrrolidine- α -carbonique a lieu. Un examen attentif des équations données à la page 142 fera voir que la formation d'un dérivé de l'acide pyrrolidine- α -carbonique est difficilement réalisable tant que le groupement phtalimide inaltéré fait partie de la molécule. Ce n'est qu'à la suite de la rupture de ce groupe par traitement avec de l'hydroxyde de sodium qu'on est naturellement amené à imaginer une fermeture de la chaîne pendant le chauffage subséquent en présence de l'acide chlorhydrique; car alors l'équation (c) subira la modification suivante:

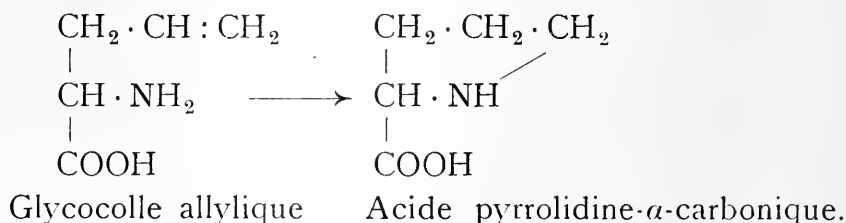


Nous avons déjà indiqué¹⁾ que l'acide α -amino- δ -oxyvalérique libre même, chauffé en présence de l'acide chlorhydrique, peut être transformé en acide pyrrolidine- α -carbonique, d'où il résulte qu'il est probable que partie, si non la totalité de l'acide pyrrolidine- α -carbonique, s'est formée de cette façon. D'un autre côté, le dédoublement que je viens de signaler de la combinaison phtalique, me semble être d'une telle simplicité que j'ai cru devoir y attirer l'attention à elle aussi; de plus, on a affaire ici à

¹⁾ Pour les détails, voir la 3^{me} partie de ce mémoire.

des conditions analogues à celles dans lesquelles un dédoublement de protéine est censé avoir lieu; car là aussi, le groupe NH avant la scission, est probablement rattaché à un groupe CO.

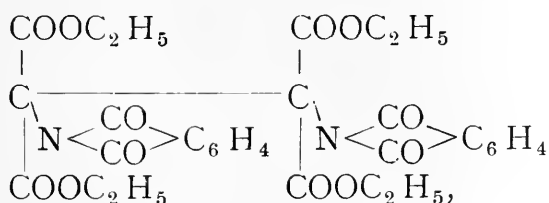
Enfin on pourrait penser que l'acide pyrrolidine- α -carbonique avait pris naissance par une transposition de la glycolle allylique de formation primaire, transposition rendue probable par un simple examen des formules que voici:



Si maintenant on considère que dans la préparation de l'éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique, il se forme en même temps environ 25 % d'une combinaison produisant de la glycolle, et que l'acide oxyaminé brut contient une quantité à peu près correspondante d'acide pyrrolidine- α -carbonique, on verra qu'il est naturel de croire à une cause commune qui puisse expliquer les deux phénomènes. Nous avons vu dans ce qui précède qu'il serait naturel d'admettre une réaction du bromure de triméthylène sur l'éther phthalimido-sodomalonique avec formation du bromure de sodium, du bromure d'allyle et de l'éther phthalimidomalonique libre fournissant la glycolle, et nous avons également vu qu'avec une autre partie de l'éther phthalimido-sodomalonique le bromure d'allyle pourrait fournir une combinaison qui, scindée ultérieurement, devrait donner de la glycolle allylique. Or, si cette dernière pouvait être convertie en acide pyrrolidine- α -carbonique, on parviendrait à se rendre aisément compte de toutes les réactions en question. Mais cette conjecture ne s'accorde point avec les faits établis: ainsi qu'on va le voir vers la fin de ce mémoire, on peut facilement obtenir l'éther allyle-phthalimidomalonique en traitant l'éther phthalimido-sodomalonique par l'iodure d'allyle, et la glycolle allylique obtenue au moyen du dédoublement subséquent par l'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique présente des propriétés fort différentes de celles de l'acide pyrrolidine- α -carbonique et ne paraît nullement disposée à se changer en cet acide. C'est donc par pur hasard que les substances fournissant de la glycolle, d'une part et, de l'autre, l'acide pyrrolidine- α -carbonique, corre-

spondent passablement bien comme quantité; la genèse de celles-là n'a pas encore été éclaircie, tandis que celle de l'acide pyrrolidine- α -carbonique a probablement lieu comme on l'a indiqué plus haut (voir p. 145).

En traitant d'une manière convenable deux molécules-grammes d'éther phtalimido-sodomalonique par une molécule-gramme de bromure de triméthylène, on obtient l'éther triméthylène-diphtalimidomalonique ci-dessus nommé (voir p. 143), et qui par décomposition au moyen d'hydroxyde de sodium, puis évaporation en présence d'acide chlorhydrique, fournit l'acide α - ε -diaminopimélique. En opérant d'une manière tout à fait analogue, mais en remplaçant le bromure de triméthylène par du bromure d'éthylène ou de l'iodure de méthylène, je suis arrivé à préparer l'acide α - ε -diaminoadipique respectivement α - γ -diaminoglutarique. Enfin j'espère obtenir l'acide α - β -diaminosuccinique à partir de l'éther diphtalimidomalonique:



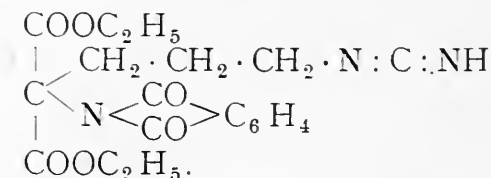
corps obtenu en traitant l'éther phtalimido-sodomalonique par l'éther phtalimido-bromomalonique très accessible et que E. Biilmann¹⁾ a le premier isolé. La synthèse de ces acides diaminés bibasiques acquiert un intérêt tout particulier grâce à la découverte de Zd. H. Skraup²⁾, publiée il y a quelques mois, de l'existence d'un acide diaminoadipique et d'un acide diaminoglutarique parmi les produits de dédoublement de la caséine. Nous n'avons pas à entrer ici dans les procédés de préparation de ces acides, ces procédés n'ayant pas encore été établis en détail; aussitôt qu'ils le seront, j'en donnerai une description détaillée dans un mémoire à part. Je tiens à remercier ici encore M. le Dr. Weis du concours qu'il m'a prêté au cours des recherches provisoires que je viens d'exposer.

Il est à présumer que par traitement avec des combinaisons convenables de métaux alcalins, l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique pourra fournir plusieurs substances intéressantes. De

¹⁾ Studier over organiske Svovlforbindelser, Copenhague 1904, p. 92.

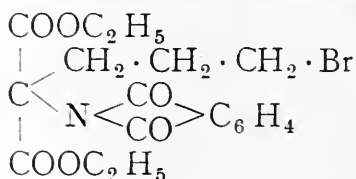
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1596 (1904), et Zeitschr. physiol. Ch. 42, 274 (1904).

même que le traitement avec l'acétate de potassium mène à l'acide α -amino- δ -oxyvalérique, il est probable qu'un traitement par le xanthogénate de potassium suivant la méthode de E. Biilmann¹⁾ provoquera la formation d'un produit capable de fournir l'acide α -amino- δ -thiovalérique. De plus, on a reconnu que, traité par le cyanamidure de sodium ($\text{NH}:\text{C}:\text{NNa}$) maintenant très accessible²⁾, le bromure cité déjà plusieurs fois fournit l'éther γ -cyanamidopropyle-phtalimidomalonique:



Si l'on soumet ce composé à un traitement par de l'ammoniaque ou des sels ammoniacaux, il est à présumer que le groupe cyanamide, fixant de l'ammoniaque se convertira en groupement guanidine ($\begin{array}{c} -\text{NH} \cdot \text{C} \cdot \text{NH}_2 \\ \text{NH} \end{array}$) et que, par conséquent, il sera possible de préparer synthétiquement l'acide α -amino- δ -guanidinovalérique, c'est-à-dire l'arginine ou un isomère de ce corps. M. A. C. Andersen se livre en ce moment dans notre laboratoire à des expériences dans ce sens.

1. Éther γ -brompropyle-phtalimidomalonique.



Dans un ballon de $\frac{3}{4}$ l. muni d'un réfrigérant ascendant surmonté d'un tube recourbé en U et renfermant du chlorure de calcium, j'ai traité $\frac{2}{5}$ molécules grammes d'éther phtalimidosodomalonique³⁾ par 1 kgr. de bromure de triméthylène dans le bain d'huile à 165^0 — 170^0 . Dès que le bain d'huile eut atteint cette

¹⁾ Studier over organiske Svovlforbindelser, Copenhague 1904.

²⁾ Le cyanamidure disodique ($\text{NaN}:\text{C}:\text{NNa}$) du commerce, trituré et lavé à l'alcool absolu et finalement lavé à l'éther, donne du cyanamidure monosodique qui, abandonné quelque temps dans le vide sulfurique a cédé tout l'éther adhérent et formé une poudre blanche et extrêmement fine.

³⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 10 (1902).

température, la réaction se déclara et parut terminée au bout de 3—4 heures. Durée totale de la chauffe: 5 heures. Ensuite, l'excès de bromure de triméthylène fut entraîné à la vapeur d'eau. Ou recueillit 910—915 grammes de bromure de triméthylène desséché, puis rectifié (consommation calculée $\frac{2}{5} \times 202 = 81$ grammes). Par refroidissement complet dans l'eau glacée, l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique prit une consistance sirupeuse, et après décantation de la solution aqueuse de bromure de sodium, j'ai pu employer directement le corps bromé dans le traitement ultérieur par l'acétate de potassium, dont description plus loin. Cependant, pour pouvoir déterminer exactement la teneur en corps bromé de l'huile obtenue, j'ai ordinairement dissous celle-ci dans l'éther, puis desséché la solution étherée au moyen de chlorure de calcium et enfin éliminé l'éther dans un ballon taré, terminant par des évacuations répétées. Le poids du résidu était de 158—160 grammes ($\frac{2}{5}$ molécules-grammes du composé bromé pèsent 170^{gr,4}), sa teneur en brome oscillait entre 14,41 % et 15,59 %, en azote entre 3,39 % et 3,54 %, tandis que la théorie exige 18,76 % de brome et 3,29 % d'azote. En supposant que la quantité tout entière de brome y existe sous la forme du bromure cherché, il en ressortirait que les produits obtenus renferment une quantité d'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique comprise entre 76,8 et 83,1 %.

Pour nous rendre compte de la répartition de l'azote, prenons un exemple:

80 % de 159 gr. correspondent à 127^{gr,2} du corps bromé.

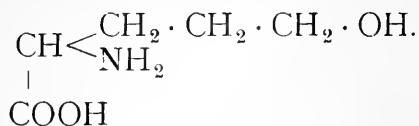
127^{gr,2} du corps bromé renfermant 3,29 % d'azote correspondent à 4185 mgr. d'azote, soit, par rapport à la totalité de l'azote ($\frac{2}{5} \times 14040 = 5616$ mgr.) 74,5 %.

Les $\frac{3}{4}$ environ de l'azote de l'huile existent donc à l'état de bromure, tandis que, comme nous l'avons vu dans l'introduction du présent mémoire (voir p. 144), le reste se retrouve dans des combinaisons exemptes de brome et qui, traitées par l'hydroxyde de soude, puis par l'acide chlorhydrique, donnent naissance à la glycocolle.

Je n'ai pas réussi à débarrasser le corps bromé de ces impuretés, parce que le mélange obtenu se dissout facilement et complètement dans tous les dissolvants ordinaires, sauf l'eau et la ligroïne. Le composé bromé est presque insoluble dans l'eau, difficilement soluble dans la ligroïne, même à chaud, et

l'on ne peut le purifier par extraction à la ligroïne; car la teneur en brome de la partie entrant en dissolution reste à peu de chose près identique à celle du résidu.

2. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.



156 grammes d'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique avec une teneur en brome de 14,76 % et une teneur en azote de 3,54 %, furent mis en jeu.

14,76 % de brome correspondent à 78,7 % de combinaison bromée, et 78,7 % de 156 gr. font 122 gr,8.

122 gr,8 de corps bromé avec une teneur en azote de 3,29 % renferment 4040 mgr. d'azote.

La teneur totale en azote étant de 5522 mgr., il s'en suit que la matière première contient

4040 mgr. d'azote en forme de composé bromé

1482 mgr. — — — de corps fournissant de la glycocolle, et autres impuretés.

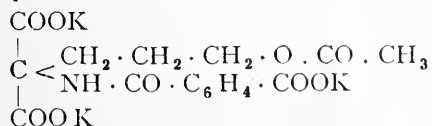
J'ai fait dissoudre le composé bromé dans un ballon de deux litres renfermant $\frac{1}{2}$ l. d'alcool chaud à 93 %. Ensuite j'y ai ajouté une solution chaude de 150 grammes d'acétate de potassium dans 200 cc. d'eau, solution qui avait été préalablement rendue neutre au tournesol par addition d'un peu d'acide acétique. L'addition de cette solution au corps bromé provoqua un léger trouble de consistance huileuse, que j'ai fait disparaître en ajoutant encore 100 cc. d'alcool. Puis, après avoir muni le ballon d'un réfrigérant ascendant, j'ai abandonné, pendant 20 heures, à la chaleur d'un bain d'eau en pleine ébullition. De cette manière j'ai obtenu une transformation complète de la combinaison bromée en l'acétate correspondant, car l'échantillon prélevé a donné, après évaporation de l'alcool, un résidu huileux qui, après des lavages répétés à l'eau, fut reconnu exempt de brome¹⁾.

¹⁾ A côté de la réaction principale, une ou plusieurs réactions secondaires se sont manifestement produites, car, par traitement avec de l'eau, le résidu huileux sus-indiqué est entré partiellement en dissolution en donnant lieu à une réaction fortement acide. L'acétate de potassium a probablement exercé une action saponifiante sur l'éther malonique et peut-être amené l'ouverture

Après refroidissement jusqu'à la température ordinaire, on verse la solution dans une capsule en porcelaine de quatre litres renfermant une solution de 100 cc. d'hydroxyde de sodium dans 300 cc. d'eau. Après un chauffage du mélange pendant trois heures, tout l'alcool pour ainsi dire, s'est évaporé, et la saponification (voir l'équation (b) p. 142) est vraisemblablement achevée; car, étendu avec de l'eau, l'échantillon prélevé reste tout à fait limpide. Après avoir refroidi le mélange dans l'eau glacée, je l'ai sursaturé de doses successives d'acide chlorhydrique concentré (en tout 600 cc.), puis j'ai fait évaporer au bain-marie, en agitant finalement à plusieurs reprises, ce qui fit prendre à la substance la consistance d'une bouillie claire. Celle-ci, outre des sels chlorhydriques de potassium et de sodium et de l'acide phtalique, renferme comme produit principal le chlorhydrate de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique (voir l'équation (c) p. 143) et en même temps, comme produits de transformation de l'oxyacide, le chlorhydrate de l'acide pyrrolidine- α -carbonique, enfin les produits de décomposition de l'impureté de la matière première: acide phtalique et chlorhydrate de glycocolle.

Ayant, dans le but de séparer ces corps les uns des autres, trituré la masse en y ajoutant 300 cc. d'acide chlorhydrique concentré, j'ai refroidi à la glace, puis filtré à la trompe au travers d'une couche double de papier durci, puis lavé, avec 1 l., en tout, d'acide chlorhydrique à 33 %¹⁾, le mélange non dissout des sels chlorhydriques de potassium et de sodium et de l'acide phtalique. Après avoir fait évaporer au bain-marie les liquides filtrés et de lavage jusqu'à volume d'environ 200 cc. j'ai dilué avec un volume égal d'eau et extrait à l'éther le reste de l'acide phtalique²⁾.

du noyau phtalique, donnant ainsi naissance au sel potassique de l'acide phtalamique correspondant



et mettant en liberté l'acide acétique. Enfin, il est également permis de croire qu'une partie de l'acétate ait produit, par hydrolyse, l'oxyacide et l'acide acétique libre.

¹⁾ Cfr. ces mêmes Comptes-rendus 6, 25 (1902).

²⁾ Pour extraire totalement l'acide phtalique de la solution, qui en contient ordinairement env. 4 gr., il faut agiter à plusieurs reprises avec d'abondantes quantités d'éther, jusqu'à ce qu'on n'en obtienne plus. L'évaporation de la

La solution chlorhydrique débarrassée de l'acide phtalique fut chauffée au bain-marie dans un ballon afin de chasser l'éther, puis évaporée au bain-marie, avec agitations répétées vers la fin. La solution ayant alors pris une consistance sirupeuse, je l'ai abandonnée sur de l'acide sulfurique, afin de la débarrasser, autant que possible, de son eau. Ensuite, en refroidissant à la glace, j'ai traité la masse sirupeuse par 300 cc. d'alcool absolu, dans lequel les chlorhydrates des acides aminés entrèrent peu à peu, dans le courant de quelques heures, en solution, tandis que les chlorhydrates de sodium et de potassium y sont restés à l'état non dissous. J'ai filtré ces chlorhydrates à la trompe sur du papier durci et les ai lavés quatre fois à l'alcool absolu. Il est de toute nécessité d'effectuer ce traitement par l'alcool avec un soin minutieux, et il faut surtout avoir soin d'éliminer l'eau autant que possible, parce que les chlorures alcalins, qui entrent alors en solution, ne peuvent pas être éliminés plus tard, et ils sont susceptibles de causer des difficultés dans la préparation du sel cuivrique de l'oxyacide (voir p. 159).

La solution alcoolique obtenue, renfermant les chlorhydrates des acides aminés (l'oxyacide, l'acide pyrrolidinecarbonique et la glycolle) fut diluée avec son volume d'eau et l'alcool distillé dans le vide. Il fallut alors débarrasser la solution aqueuse résiduelle de toute son acide chlorhydrique. Pour ce, on aurait évidemment pu avoir recours au carbonate d'argent. Voici cependant un procédé moins coûteux, bien qu'un peu plus compliqué: On dilue dans une grande capsule de porcelaine jusqu'à un volume d'un litre environ, puis on y ajoute au bain-marie et en remuant bien, de petites portions de céruse (200 gr. en tout), et l'on chauffe pendant six heures. Abandonné au repos jusqu'au lendemain, le dépôt fut filtré et soigneusement lavé à l'eau froide. Après ce traitement, la solution présentait encore une réaction fortement acide, et elle contenait quelque peu d'acide chlorhydrique et un peu de plomb. Toutefois une addition relativement insignifiante de carbonate d'argent humide suffit pour

solution chlorhydrique sus-mentionnée jusqu'à consistance huileuse, suivie d'un traitement renouvelé de cette dernière par l'acide chlorhydrique, permettrait d'en éliminer encore un peu de sel marin et d'acide phtalique; mais on risque alors que les évaporations répétées en présence de l'acide chlorhydrique aient pour conséquence de convertir d'assez grandes proportions de l'oxyacide en acide pyrrolidine- α -carbonique.

la faire réagir nettement alcaline, et dès lors elle ne contenait plus ni chlore ni plomb, mais bien un petit excès d'argent. J'ai ensuite filtré de nouveau et lavé à l'eau, puis j'ai précipité l'argent et neutralisé le liquide en y ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique (finalement très étendu). Quand le liquide présentait une réaction neutre (c.-à.-d. quand elle faisait virer la couleur tant du papier rouge que du papier bleu de tournesol), il y avait toujours une quantité très peu abondante de chlore, provenant évidemment de ce que les chlorures alcalins n'avaient pu être éliminés complètement. Je procédai alors à une nouvelle filtration, mais de préférence après avoir laissé reposer jusqu'au lendemain, parce que sans cela le chlorure d'argent est susceptible de traverser le filtre.

La solution obtenue avait un volume total d'environ $2\frac{1}{2}$ l., et l'on reconnut que sa teneur totale en azote était de 5402 mgr., s'élevant ainsi à 97,8 % de celle de la matière première. La solution fut évaporée sous pression réduite jusqu'à un petit volume, puis filtrée à travers un petit filtre pour en séparer quelques flocons obscurs. Le liquide filtré fut évaporé au bain-marie, en remuant constamment vers la fin de cette opération, jusqu'à ce que la masse chaude commençât à se cristalliser; au refroidissement, la masse se prit entièrement en une pâte cristalline molle et faiblement colorée. On abandonna celle-ci jusqu'au lendemain sur de l'acide sulfurique afin de la débarrasser autant que possible de son eau. Cela fait, je l'ai broyée dans la capsule même en présence de 200 cc. d'alcool absolu. Au bout de deux ou trois heures de triturations répétées, tous les grumeaux avaient disparu, après quoi, la solution alcoolique jaune (A) (qui renfermait l'acide pyrrolidine- α -carbonique, mais seulement une petite quantité de l'oxyacide et de la glyocolle) ayant été filtrée à la trompe, le mélange non dissous et presque incolore des deux derniers acides aminés fut soigneusement lavé quatre fois à l'alcool absolu. Séché à l'air, le mélange de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique et de la glyocolle pesait 36^{gr},8 (B).

a. Isolation de l'acide pyrrolidine- α -carbonique de la solution (A). Nous avons vu que cette solution, dont la teneur en azote était d'environ 1100 mgr., renfermait, outre de l'acide pyrrolidinecarbonique, de l'oxyacide et de la glyocolle en proportions minimes. Mais j'y ai aussi trouvé, révélée déjà par la coloration jaune de la solution, la masse principale des

impuretés indéterminées qui se forment toujours dans les synthèses des corps organiques. J'ai mélangé la solution (A) avec une autre obtenue d'une manière analogue au cours d'une autre expérience.

Après avoir distillé l'alcool et redissous le résidu dans de l'eau, j'ai décoloré au moyen de noir animal et réduit le liquide filtré jusqu'à un petit volume. Ensuite j'ai filtré de nouveau et concentré jusqu'à consistance sirupeuse. En raison des impuretés qu'elle renfermait, la masse ne s'est prise que partiellement par abandon au-dessus de l'acide sulfurique. Après broiement de la masse avec de l'alcool absolu, comme décrit précédemment, il en restait encore 2 gr. à l'état non dissous; comme on pouvait s'y attendre, ceux-ci se composaient d'un mélange d'oxyacide et de glycolle. Par évaporations répétées de la solution alcoolique, avec addition d'eau, j'en ai chassé tout l'alcool, puis redissous le reste huileux dans 200 cc. d'eau dans une capsule en porcelaine. J'ai ajouté à la solution 50 cc. d'acide sulfurique deux-normal et précipité l'acide pyrrolidine- α -carbonique en y versant avec précaution un petit excès d'acide phosphotungstique à 50 % environ. Au commencement, le sel phosphotungstique se précipita à l'état huileux présentant une teinte légèrement brunâtre; mais le précipité final se composait de beaux cristaux blancs, que le microscope nous montra comme de courts prismes à 4 pans, rappelant souvent ceux du spath calcaire. Abandonnée jusqu'au lendemain, la masse huileuse s'était complètement cristallisée et pouvait être concassée, après quoi je filtrai à la trompe et lavai quatre fois avec un peu d'eau froide. Le sel phosphotungstique est facilement soluble dans l'alcool qui, par conséquent, doit être éliminé entièrement avant la précipitation. L'eau chaude le dissout assez facilement, et il est loin d'être insoluble même dans l'eau froide, ce qui fait qu'il ne saurait être question d'obtenir un rendement tout à fait quantitatif par cette voie.

Pour arriver à un acide pyrrolidinecarbonique parfaitement pur, j'ai décomposé le précipité phosphotungstique originaire après l'avoir lavé, de la manière ordinaire, c'est-à-dire, à l'aide d'un petit excès d'eau de baryte saturée. La solution ainsi obtenue fut débarrassée de la baryte, par addition d'un petit excès d'acide sulfurique. Après avoir évaporé jusqu'à un volume de 150 cc. et additionné de 30 cc. d'acide sulfurique 2-normal, j'ai pré-

cipité par l'acide phosphotungstique de la même manière qu'au paravant. Le précipité que j'obtins par cette seconde précipitation, fut décomposé au moyen de l'eau de baryte, et la solution ainsi obtenue, fut débarrassée de la baryte par un tout petit excès d'acide sulfurique. La filtration, puis l'évaporation du liquide au bain-marie, me donnèrent un résidu qui après refroidissement se prit totalement en une masse dure et facile à réduire en poudre. Cette masse, dont le poids était de 10^{gr},8, avait une teneur en azote de 1145 mgr. et était constituée d'acide pyrrolidine- α -carbonique presque pur avec 1 mol. d'eau de cristallisation.

En ce qui concerne le rendement de cet acide, il faut bien entendu tenir compte de ce fait que la précipitation par l'acide phosphotungstique n'est pas complètement intégrale. J'ai donc cherché à me rendre compte de la proportion d'acide pyrrolidinecarbonique contenue dans les filtrats des deux précipitations par l'acide phosphotungstique. A cet effet, j'ai éliminé d'abord l'acide phosphotungstique à l'aide d'eau de baryte, puis l'excès de cette dernière au moyen d'une quantité exactement correspondante d'acide sulfurique; finalement j'ai fait évaporer au bain-marie. Le résidu qui en résulta, ne se prit pas au refroidissement; en reprenant par l'alcool absolu, on eut un reste non dissous (1^{gr},5 d'oxyacide + glycolle) et une solution alcoolique; après évaporation de l'alcool et dissolution du reste dans 100 cc. d'eau et 20 cc. d'acide sulfurique 2-normale on précipita par l'acide phosphotungstique. La précipitation totale exigea $\frac{1}{5}$ environ de la quantité d'acide phosphotungstique que la dernière des précipitations indiquées plus haut avait demandée, laquelle avait fourni 10^{gr},8 d'acide pyrrolidinecarbonique renfermant 1145 mgr. d'azote. On peut donc évaluer approximativement l'acide pyrrolidinecarbonique en jeu à $\frac{1}{5} \times 10^{\text{gr}},8$, avec une teneur en azote de $\frac{1}{5} \times 1145 = 229$ mgr.

Les quantités sus-indiquées provenant de deux essais exécutés de la même manière, il ressort que la teneur en azote de la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique formée dans un essai peut s'évaluer à $\frac{1145 + 229}{2} = 687$ mgr. d'azote, soit, par rapport à la teneur en azote de la matière première (éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique, 4040 mgr. d'azote, v. p. 150), 17⁰/₀.

10^{gr},7 de l'acide pyrrolidine- α -carbonique obtenu furent dissous assez facilement et presque totalement dans 100 cc. d'alcool absolu chaud. Après filtration, la solution, légèrement colorée, n'a pas donné de dépôt au refroidissement; mais si on la remue et la frotte à la spatule, on voit bientôt l'acide se déposer sous forme de beaux cristaux. Ayant abandonné la solution jusqu'au lendemain, je recueillis le dépôt qui, au microscope, se révéla sous forme de prismes à 4 ou 6 pans, parfois de lamelles quadrilatères.

Après quatre lavages avec un peu d'alcool absolu, puis dessiccation à l'air jusqu'à disparition presque complète de l'odeur d'alcool, l'acide attestait un poids de 4^{gr},7; abandonné jusqu'au lendemain à l'action de l'air, il pesait de 5^{gr},3, phénomène dû évidemment à ce que l'acide pyrrolidine- α -carbonique cristallise dans l'alcool à l'état anhydre, alors qu'abandonné à l'air atmosphérique, il absorbe 1 mol. d'eau de cristallisation. L'acide n'a été jusqu'à présent analysé, à ma connaissance, qu'à l'état anhydre, après dessiccation d'une manière quelconque, soit dans le vide sur l'anhydride phosphorique¹⁾ ou dans le vide à 40°²⁾.

0^{gr},5139 d'acide pyrrolidinecarbonique séché à l'air, perdaient facilement et rapidement dans le vide sulfurique 0^{gr},0697 (13,56 %); abandonné plus longtemps, l'acide ne changeait pas de poids. Un repos subséquent sur de l'eau pendant un jour, lui a fait absorber plus de 13,56 % d'eau, et dans un séjour prolongé sur de l'eau il en a continuellement attiré de petites quantités, ce qui a eu pour effet de le rendre un peu déliquescent. Abandonné ensuite à l'action de l'air, il perdit de l'eau et revint à son poids primitif de 0^{gr},5139; ce dernier ne varia plus, même après un séjour ultérieur à l'air.

1^{gr},1908 d'acide séché à l'air, laissés dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant, ont perdu 0^{gr},1608 (13,50 %).

0^{gr},1623 de l'acide anhydre, correspondant à 0^{gr},1876 d'acide séché à l'air, ont donné 0^{gr},3100 d'acide carbonique et 0^{gr},1130 d'eau, ce qui, par rapport au poids de l'acide séché à l'air, correspond à 45,07 % de carbone et 6,74 % d'hydrogène.

0^{gr},1688 d'acide séché à l'air ont donné, au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à 17^{cc},52 de solution d'hyposulfite³⁾, ce qui correspond à 10,38 % d'azote.

		Calculé	Trouvé	
C ₅	60,00	45,07	45,07	
H ₉	9,07	6,81	6,74	
O ₂	32,00	24,04		
N	14,04	10,55	10,38	
H ₂ O	18,02	13,53	13,56	13,50
C ₅ H ₉ O ₂ N, H ₂ O		133,13	100,00	

L'acide pyrrolidine- α -carbonique séché à l'air, commença à fondre dans son eau de cristallisation au-dessous de 100°. Par

¹⁾ E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 459 (1901).

²⁾ E. Fischer: Zeitschr. physiol. Chemie 33, 164 (1901).

³⁾ Les solutions d'hyposulfite dont je me suis servi dans les essais relatés dans le présent mémoire, ont une concentration telle qu'un centimètre cube répond à 1 mgr. d'azote.

chauffage ultérieur, l'eau s'évapore, et l'acide se figea de nouveau pour ne devenir fusible qu'à 208 à 209° (corrigé). L'acide anhydre fondit à 210 à 211° (corrigé) et prit une teinte légèrement brune.

Je me suis servi de l'eau-mère et de l'alcool de lavage de l'acide pyrrolidine- α -carbonique cristallisé pour en préparer le sel cuivrique. Pour cela, on chasse l'alcool par distillation, reprend le résidu à l'eau et chauffe la solution aqueuse, décolorée par le noir animal, au bain-marie pendant deux ou trois heures avec du carbonate de cuivre en excès, puis on évapore au bain-marie, jusqu'à cristallisation abondante, la solution bleu foncé ainsi obtenue. Après abandon jusqu'au lendemain, on recueille le dépôt d'un joli bleu éclatant et qui se compose de feuillets cristallins, dont les formes, examinées au microscope, se trouvent être presque exclusivement rhomboïdales. On lave, à la trompe, 2 fois avec un peu d'eau, puis avec de l'alcool à 55 % et, bien rapidement (v. p. 176), avec de l'alcool absolu.

Séché à l'air, le sel contient 2 mol. d'eau de cristallisation; en cédant celles-ci, il change de couleur, prenant une belle teinte violette. Tous ces faits s'accordent parfaitement avec les indications de Willstätter¹⁾ et de E. Fischer²⁾. J'ai obtenu un rendement en sel cuivrique séché à l'air de 5^{gr},5; mais en concentrant l'eau-mère et la précipitant par l'alcool, j'ai pu en retirer encore 0^{gr},9 de sel de cuivre essentiellement analogue au produit principal, bien que renfermant une proportion insignifiante de sulfate de cuivre.

1^{gr},1869 de sel cuivrique séché à l'air, cédaient dans le vide à 70° pendant 24 heures 0^{gr},1302 (10,97 %). Abandonné au-dessus d'eau, le sel a réabsorbé 0^{gr},1313 et repris sa couleur bleue.

1^{gr},3042 de sel séché à l'air, ont perdu de la même manière 0^{gr},1431 (10,97 %).

0^{gr},1703 donnaient par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 14^{cc},53 d'hyposulfite (8,53 % d'azote).

0^{gr},2599 donnaient 0^{gr},0630 oxyde cuivrique correspondant à 19,37 % de cuivre.

0^{gr},5681 d'une préparation provenant d'un autre essai et qui furent placés dans le vide sulfurique, perdaient pendant 24 heures 0^{gr},0171, en prenant une coloration violette. Pendant un séjour prolongé dans le vide sulfurique, la perte va en augmentant, pour devenir constante au bout d'une semaine: 0^{gr},0622 (10,95 %). Abandonnée sur de l'eau, la matière en a réabsorbé en tout 0^{gr},0627.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 33, 1164 (1900).

²⁾ Ibid. 34, 458 (1901).

0^{gr},2133 de cette dernière préparation donnaient une quantité d'ammoniaque répondant à 18^{cc},16 d'hyposulfite (8,51 % d'azote).

		Calculé	Trouvé			
C ₁₀	120,00	36,60				
H ₁₆	16,13	4,92				
O ₄	64,00	19,52				
N ₂	28,08	8,57	8,53			8,51
Cu	63,60	19,40	19,37			
2 H ₂ O	36,03	10,99	10,97	10,97		10,95
(C ₅ H ₈ O ₂ N) ₂ Cu, 2 H ₂ O		327,84	100,00			

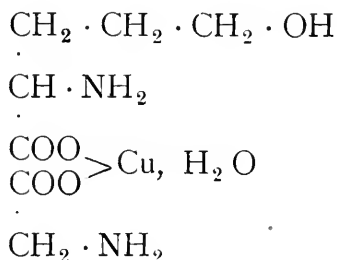
b. Préparation d'acide α -amino- δ -oxyvalérique pur du mélange de cet acide avec la glycocolle. Le mélange obtenu (B. v. p. 153) de l'oxyacide avec la glycocolle pesait, séché à l'air. 36^{gr},8. Un petit échantillon était soluble dans l'eau, la solution aqueuse présentait une réaction faiblement acide, renfermait une trace de chlore, et ne donnait pas de précipité avec l'acide phosphotungstique. Un dosage de l'azote en a donné 11,57 %, de sorte que la teneur totale en azote des 36^{gr},8 s'élevait à 4258 mgr.

36^{gr},5 de ce mélange ont été dissous au bain d'eau bouillante dans 600 + 50 + 50 + 50 cc. d'alcool à 80 %; il est resté 1 gr. env. à l'état non dissous et constitué principalement de glycocolle, la teneur en azote étant de 16,88 %.

Après dilution de la solution alcoolique avec de l'eau, j'ai distillé l'alcool dans le vide, étendu de nouveau avec de l'eau la solution aqueuse restante, puis soumis à un traitement, au bain-marie, par un excès de carbonate de cuivre (4×10 gr.). La solution bleu foncé ainsi obtenue, fut filtrée et évaporée au bain-marie jusqu'à un volume de 200 à 250 cc., où la cristallisation commença déjà à chaud; le lendemain la masse entière avait pris une consistance de bouillie claire. Les cristaux furent recueillis, lavés, à la trompe, 2 fois avec de l'eau, puis avec de l'alcool à 55 %, et finalement à l'alcool absolu. Séchée à l'air, la poudre, d'un bleu violet et qui avait un bel éclat soyeux, pesait 23^{gr},1. Il résulta de l'analyse que le sel séché à l'air contenait une petite quantité d'eau (1,60 %), qui disparut entièrement par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; le sel anhydre avait une teneur en azote de 8,69 %, c'est-à-dire très peu supérieure à la teneur théorique: 8,57 %.

Par évaporation des eaux mères et de lavage jusqu'à un volume d'environ 40 cc., réfrigération à l'eau glacée, filtration, lavage avec 3×25 cc. d'eau froide et recristallisation du sel cuivrique restant dans une portion d'eau aussi petite que possible, je pus obtenir encore 4^{gr},2 de sel cuivrique presque pur. (Séchée à l'air, la substance contenait 2,55 % d'eau, le sel anhydre renfermait 8,79 % d'azote.)

Quoique le sel cuivrique de l'acide aminooxyvalérique soit relativement peu soluble dans l'eau, il n'a pas été possible d'en obtenir directement à l'état de pureté plus de la quantité ci-dessus indiquée, parce que le sel cuivrique de la glyocolle s'unit à celui de l'oxyacide pour former un sel double très soluble. Ce sel double put être obtenu à l'état passablement pur par évaporation des eaux mères et de lavage jusqu'à un très petit volume (10—20 cc.), suivie d'une précipitation par un très grand excès d'alcool. Après deux ou trois heures de repos, le dépôt volumineux fut recueilli et lavé deux ou trois fois à l'alcool absolu. Séché à l'air, le dépôt pesait 13^{gr},5; il contenait 6,02 % d'eau, et à l'état anhydre 10,51 % d'azote, tandis que le sel double



doit contenir 6,26 % d'eau, et le sel déshydraté 10,41 % d'azote (voir en outre p. 166).

Il est à remarquer que d'autres expériences m'ont donné des sels dont les teneurs en eau et en azote s'écartent un peu plus de celles calculées pour ledit sel double; mais ces écarts peuvent aisément s'expliquer en admettant la présence d'un excès du sel de l'oxyacide ou de celui de la glyocolle; la teneur en eau a oscillé entre 5,53 % et 7,37 %, et la teneur en azote du sel anhydre entre 9,85 % et 10,55 %.

L'eau-mère alcoolique du sel double ci-dessus mentionné, présentait encore une couleur d'un bleu prononcé et renfermait plus de 300 mgr. d'azote, mais en même temps un peu de chlore, ainsi que, probablement, d'autres impuretés encore, et il était impossible d'en obtenir sans trop de peine des sels cuivriques

purs et surtout exempts de chlore. D'un autre côté, à partir du sel double indiqué plus haut, je pus assez facilement préparer le sel cuivrique de l'oxyacide à l'état presque pur; pour cela, il est préférable d'unir les sels doubles provenant de plusieurs essais, ce qui fournit aussi le meilleur rendement. Après avoir dissous le sel dans de l'eau, je l'ai privé de son cuivre au moyen de l'hydrogène sulfuré (v. p. 161) et traité le mélange obtenu d'équivalents presque égaux d'oxyacide et de glycolle par l'alcool chaud à 80 %. La majeure partie de la glycolle est restée à l'état non dissous, alors que la solution, après distillation de l'alcool et traitement par le carbonate de cuivre de la manière décrite plus haut, put fournir le sel cuivrique de l'acide oxyaminé à l'état presque parfaitement pur.

L'éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique, qui a servi de matière première, m'a donc fourni les produits suivants:

1° De l'acide pyrrolidine- α -carbonique (v. p. 155): environ 17 % de la quantité possible.

2° 26^{gr},8 de sel cuivrique déshydraté de l'oxyacide aminé: environ 57 % de la quantité possible.

3° Les 13^{gr},5 de sel double obtenus renferment à peu près la moitié (667 mgr.) de l'azote sous forme d'oxyacide, quantité d'azote qui, par rapport à celle de la matière première (4040 mgr.), monte à 16,5 % environ.

En tout, environ 90 %.

A l'effet d'une purification complète, j'ai soumis le sel cuivrique de l'oxyacide à une nouvelle cristallisation dans de l'eau. Une solution de 50 gr. de sel cuivrique dans environ 800 cc. d'eau chaude, à été filtrée pour la séparer d'une petite quantité d'un sel cuivrique bleu violet, à grains fins, presque insoluble dans l'eau même chaude; c'était vraisemblablement le sel cuivrique de l'acide α - ε -diaminopimélique (v. p. 144). Le liquide filtré, refroidi dans l'eau, fut laissé, en agitant à plusieurs reprises, jusqu'au lendemain; alors il s'était formé un abondant dépôt cristallin soyeux bleu violet et constitué apparemment par des lamelles; celles-ci, examinées au microscope, présentaient l'aspect de petits cristaux aciculaires. de forme irrégulière et souvent réunis en faisceaux et aggrégats. Ils ont été filtrés à la trompe, lavés une fois à l'eau froide, une fois à l'alcool à 55 %, finalement à l'alcool absolu, dans lequel le sel était tout à fait insoluble. Le rendement en sel séché à l'air était de 32^{gr},4 (Sel

cuivrique A_I). L'eau-mère put servir à y dissoudre de nouvelles quantités de sel cuivrique non recristallisé, ou bien, évaporée à concentration convenable, fournir encore du sel pur (sel cuivrique A_{II} : 8^{gr},4). Le sel cuivrique séché à l'air contenait toujours une petite quantité d'humidité (0,5—1,5 %), qui a disparu par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; pour toutes les analyses ci-après j'ai employé une préparation ainsi séchée.

0^{gr},1556 de sel A_I ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 13^{cc},27 d'hyposulfite (8,53 % d'azote).

0^{gr},4855 de sel A_I ont donné 0^{gr},1174 d'oxyde de cuivre (19,32 % de cuivre).

0^{gr},2300 de sel A_I ont donné 0^{gr},3096 d'acide carbonique et 0^{gr},1256 d'eau (36,71 % de carbone et 6,11 % d'hydrogène).

0^{gr},2853 de sel A_{II} ont donné de l'ammoniaque correspondant à 24^{cc},45 d'hyposulfite (8,57 % d'azote).

0^{gr},3016 de sel B_I ont donné de l'ammoniaque correspondant à 25^{cc},87 d'hyposulfite (8,58 % d'azote).

0^{gr},1626 de sel B_I ont donné 0^{gr},0392 oxyde de cuivre (19,26 % de cuivre).

0^{gr},1796 de sel B_I ont donné 0^{gr},2404 d'acide carbonique et 0^{gr},0974 d'eau (36,51 % de carbone et 6,07 % d'hydrogène).

0^{gr},2660 de sel C_I ont donné de l'ammoniaque correspondant à 22^{cc},75 d'hyposulfite (8,55 % d'azote).

		Calculé	Trouvé			
C_{10}	120,00	36,60	36,71		36,51	
H_{20}	20,16	6,15	6,11		6,07	
O_6	96,00	29,28				
N_2	28,08	8,57	8,53	8,57	8,58	8,55
Cu	63,60	19,40	19,32		19,26	
<hr/>						
$(C_5 H_{10} O_3 N)_2 Cu$	327,84	100,00				

Dans le but de préparer l'oxyacide aminé comme tel, on a dissous 29 gr. de sel cuivrique pur dans 1 litre d'eau additionnée de 100 cc. d'acide sulfurique double-normal¹⁾. Le cuivre fut précipité par de l'hydrogène sulfuré. La précipitation achevée, on filtra, puis lava le sulfure cuivrique à l'eau aiguisée d'acide sulfurique et saturée d'hydrogène sulfuré. Ce dernier fut chassé du liquide filtré et de l'eau de lavage par chauffage et évaporation au bain-marie, et l'acide sulfurique fut éliminé au

¹⁾ Non additionnée d'acide sulfurique, le sulfure cuivrique traversait le filtre dans la filtration effectuée plus tard.

moyen d'un déficit aussi petit que possible de baryte. Après filtration, on concentra la solution dans le vide jusqu'à un petit volume, puis, ayant enlevé par filtration un peu de sulfate de baryte, on évapora au bain-marie dans une capsule, en agitant vers la fin jusqu'à ce que, même à chaud, le tout formât une bouillie. Laisseée en repos sur de l'acide sulfurique jusqu'au lendemain, la matière, qui s'était alors prise entièrement en une masse cristalline, fut triturée à l'alcool absolu, filtrée à la trompe, et lavée à l'alcool absolu. Le rendement en oxyacide (A (non recristallisé)) était de 23^{gr},0 (théorie: 23^{gr},6). L'acide, séché à l'air, contenait environ 0,3 % d'humidité, qui fut enlevée par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; il avait une faible couleur gris jaunâtre; à part cela, il était pur (voir le dosage de l'azote ci-dessous).

Pour le purifier complètement, j'ai fait recristalliser l'acide dans l'alcool à 80 %. 20 gr. d'oxyacide ayant été dissous dans 500 + 100 + 50 + 50 cc. de cet alcool, la solution fut filtrée à chaud, puis abandonnée à la cristallisation à la température ordinaire en 8 heures. L'acide oxyaminé s'est séparé sous forme de fins cristaux blancs, soyeux, apparemment lamellés; regardés au microscope, ils formaient des aggroupements de fins feuillets souvent terminés en pointe et presque aciculaires; souvent aussi, surtout parmi les cristaux formés les derniers et par conséquent le plus lentement, il se trouvait de longues aiguilles bien développées. Le précipité assez volumineux, filtré à la trompe, a été lavé une fois avec l'alcool à 80 % et deux fois à l'alcool absolu. Rendement en acide pur séché à l'air (A): 14^{gr},7. — Inutile d'ajouter que le reste de l'acide put être obtenu de l'eau-mère et de l'alcool de lavage, par distillation de l'alcool et évaporation du résidu jusqu'à siccité (v. p. 173). L'acide désigné ci-dessous comme C et obtenu par recristallisation de plusieurs de ces résidus réunis, est sous tous les rapports aussi pur que l'oxyacide A.

Les préparations d'oxyacide recristallisées contenaient constamment une trace d'eau (0,07 à 0,20 %), qui pouvait être enlevée par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; c'est de l'acide ainsi séché qui a servi pour toutes les analyses ci-dessous.

0^{gr},2313 d'oxyacide A (non recristallisé) ont donné une quantité d'ammoniaque répondant à 24^{cc},42 d'hyposulfite (10,56 % d'azote).

0^{gr},2258 d'oxyacide A ont donné de l'ammoniaque répondant à 23^{cc},75 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},2460 d'oxyacide A ont donné 0^{gr},4071 d'acide carbonique et 0^{gr},1865 d'eau (45,13 % de carbone et 8,48 % d'hydrogène).

0^{gr},2295 d'oxyacide B ont donné de l'ammoniaque répondant à 24^{cc},15 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},1991 d'oxyacide C ont donné de l'ammoniaque répondant à 20^{cc},95 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},1937 d'oxyacide D ont donné de l'ammoniaque répondant à 20^{cc},30 d'hyposulfite (10,48 % d'azote).

0^{gr},2543 d'oxyacide E ont donné de l'ammoniaque répondant à 26^{cc},75 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},1550 d'oxyacide F ont donné de l'ammoniaque répondant à 16^{cc},38 d'hyposulfite (10,57 % d'azote).

0^{gr},1776 d'oxyacide F ont donné 0^{gr},2923 d'acide carbonique et 0^{gr},1345 d'eau (44,89 % de carbone et 8,47 % d'hydrogène).

	Calculé			Trouvé					
C ₅	60,00	45,07	45,13						44,89
H ₁₁	11,09	8,33	8,48						8,47
O ₃	48,00	36,05							
N	14,04	10,55	10,56	10,52	10,52	10,52	10,48	10,52	10,57
<hr/>									
C ₅ H ₁₁ O ₃ N	133,13	100,00							

Soumis à un rapide chauffage dans des tubes capillaires au bain de glycérine jusqu'à 180° environ, puis à une élévation lente de température (à raison d'env. 10° par minute), la substance suinta à 217 à 218°, ne fondant complètement qu'à 223 à 224° (corr.), avec dégagement d'air et brunissement. Quand la température était maintenue à 208 à 210°, la substance fondait, en brunissant et se décomposant, au bout d'env. 5 minutes. L'oxyacide non recristallisé se comportait de la même manière; pourtant les fusion et décomposition complètes se produisaient déjà à 217 à 218° (corr.).

En chauffant pendant quelque temps (15 à 30 minutes) des quantités un peu plus grandes de l'oxyacide dans une étroite éprouvette fermée d'un bouchon et placée au bain d'huile à 195 à 200°, on voit des gouttes d'eau se déposer sur la partie supérieure de l'éprouvette, vraisemblablement avec transformation de l'oxyacide en acide pyrrolidine- α -carbonique. En même temps il s'est effectué des scissions plus profondes, avec dégagement d'ammoniaque ou d'autres vapeurs à réaction alcaline; la substance restante formait une masse résineuse brune.

L'oxyacide possède un goût doux. Il est très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool absolu, même à chaud, un peu

plus soluble dans l'alcool méthylique et dans l'alcool éthylique aqueux, peu soluble dans l'acétone et dans l'éther acétique, très peu soluble, sinon tout à fait insoluble, dans l'éther, le chloroforme, le benzène et la ligroïne.

Quant à la manière dont se comporte cet oxyacide vis-à-vis de l'acide phosphotungstique, voir la troisième partie de ce mémoire, p. 168.

c. Préparation de la glycocolle à partir de mélanges de ce composé avec l'acide α -amino- δ -oxyvalérique. Il ressort de ce qui précède que la glycocolle est moins soluble dans l'alcool à 80 % que l'oxyacide, et par conséquent un traitement de mélanges tant soit peu riches en glycocolle par de l'alcool chaud de ladite concentration, fera dissoudre la presque totalité de l'oxyacide, mais seulement une partie de la glycocolle. J'ai tenté de diverses manières de faire recristalliser l'oxyacide dans les alcools méthylique ou éthylique de concentrations différentes, sans pouvoir jamais obtenir par cette voie un oxyacide parfaitement exempt de glycocolle; ce n'est qu'au moyen des sels cuivriques que j'ai pu y parvenir, ainsi que je l'ai exposé plus haut. Par contre, en partant de la partie qui avait résisté à l'alcool chaud à 80 %, j'ai pu préparer sans trop de difficulté de la glycocolle pure. Une simple dissolution dans l'eau, décoloration, s'il y a lieu, au moyen du noir animal, enfin précipitation de la solution convenablement concentrée par l'alcool à volume égal, suffisaient ordinairement à fournir de la glycocolle à peu près pure.

0^{gr},1193 de glycocolle ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 22^{cc},30 d'hyposulfite (18,69 % d'azote).

0^{gr},1680 de glycocolle ont donné 0^{gr},1950 d'acide carbonique et 0^{gr},1033 d'eau (31,66 % de carbone et 6,88 % d'hydrogène).

Avant d'avoir pu constater que la substance souillant l'oxyacide brut non encore purifié par le sel cuivrique, était de la glycocolle, je le prenais pour acide diaminopimélique (v. p. 144), et j'ai cherché alors à séparer l'un de l'autre les deux acides aminés par précipitation au moyen de l'acide phosphotungstique, que je croyais devoir précipiter l'acide diaminopimélique (la glycocolle). Or, j'ai réussi parfaitement bien, et je vais donner ici une courte description des conditions dans lesquelles ces précipitations ont lieu, supposant qu'il n'est pas généralement connu que la glycocolle peut être précipitée par l'acide phosphotung-

stique avec une telle facilité que je l'ai trouvé, même en l'absence de toute autre substance précipitable par ce réactif.

Environ 20 gr. du sel double très soluble ayant été dépourvus de cuivre de la manière décrite plus haut (v. p. 161), le mélange ainsi obtenu d'oxyacide et de glyocolle à molécules à peu près égales, fut précipité dans une solution assez concentrée et acidulée d'acide sulfurique (le volume était d'environ 100 cc.) par, en tout, environ 200 cc. d'une solution forte d'acide phosphotungstique (100 cc. contenaient 108 gr. d'acide cristallisé). Il se forma un dépôt abondant constitué, ainsi qu'un examen au microscope l'a fait montrer, par des cristaux aciculaires mélangés d'agréats de cristaux plutôt lamellés et qui, laissés en repos jusqu'au lendemain, se transformèrent en prismes de 4 pans. Après filtration à la trompe, on lava avec 3×25 cc. d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 %.

Le poids du dépôt humide était d'environ 90 gr. Après dissolution dans $300 + 50 + 50$ cc. d'eau au bain-marie, j'en séparai par filtration une petite portion non dissoute et dont la structure était granuleuse. Ayant ajouté au filtrat 10 cc. d'acide phosphotungstique fort, puis refroidi et agité, on voit le sel phosphotungstique se précipiter de nouveau sous forme de jolis cristaux blancs qui, regardés au microscope, ont la forme de petits prismes assez minces ou plus souvent de tables à 4 pans et presque rectangulaires. Abandonné jusqu'au lendemain, le précipité fut filtré à la trompe et lavé trois fois à l'eau.

Le dépôt recristallisé (A), qui à l'état humide pesait 80 gr. environ, était constitué exclusivement de sel de glyocolle; car, dissous dans l'eau chaude et décomposé à l'hydroxyde de baryum de la façon habituelle, il fournissait 4^{gr,1} de glyocolle presque pure. (La teneur en azote était de 18,57 %).¹⁾

¹⁾ Les eaux-mères et les liquides de lavage de la précipitation et de la recristallisation du sel phosphotungstique de la glyocolle furent évaporés au bain-marie jusqu'à volume de 70—80 cc., puis refroidis, ce qui me donna un second dépôt (B) qui, recueilli et lavé 4 fois à l'eau glacée, puis décomposé par l'hydroxyde de baryum, fournit 3^{gr,8} d'une substance contenant environ 14% d'azote, correspondant à un mélange d'environ 40% de glyocolle et 60% d'oxyacide. Le filtrat de ce dépôt fournit, après traitement par de la baryte etc., 6^{gr,8} de substance (C) contenant 10,86% d'azote, de sorte que c'était de l'oxyacide à peu près pur. L'oxyacide faisant partie de la substance (B) fut extrait par ébullition avec de l'alcool à 80%. Après avoir additionné la solution ainsi obtenue de la substance (C), on chassa l'alcool et prépara de la façon habituelle le sel cuivrique de l'oxyacide; obtenu 6 gr. dudit sel à l'état de pureté approximative (8,67 % d'azote).

3 gr. de cette glycolle furent bouillis avec 100 cc. d'alcool à 80 %, ce qui ne fit entrer en dissolution qu'une partie fort minime. Je fis alors dissoudre le reste dans de l'eau et précipiter la solution par le double volume d'alcool, obtenant ainsi 2^{gr},3 de glycolle cristallisée d'une belle couleur blanche. Par dessiccation dans le vide à 70°, le poids ne diminua pas. Un chauffage jusqu'à 225 à 230° fit brunir la substance, elle fondit à 232 à 237° (corr.), et contenait 18,70 % d'azote.

0^{gr},0944 de glycolle ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 17^{cc},65 d'hyposulfite (18,70 % d'azote).

		Calculé	Trouvé	
C ₂	24,00	31,97	31,66	
H ₅	5,04	6,71	6,88	
O ₂	32,00	42,62		
N	14,04	18,70	18,69	18,70
<hr/>				
C ₂ H ₅ O ₂ N	75,08	100,00.		

Je vais décrire ici un certain nombre de petits essais faits par M. A. C. Andersen en vue d'éclaircir la solubilité dans l'eau des sels cuivriques de l'oxyacide et de la glycolle, soit à l'état pur, soit mélangés.

Dans ces essais nous avons fait usage d'un sel cuivrique pur de l'oxyacide, ainsi que d'un sel cuivrique de glycolle cristallisant en aiguilles et préparé à partir de la glycolle pure: $(\text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2) \left(\text{COO} - \right)_2 \text{Cu}, \text{H}_2\text{O}$. La teneur en eau de ce dernier sel était de 7,83 %, la teneur en azote du sel déshydraté: 13,10 %, en cuivre: 29,85 %, tandis que le calcul avait donné 7,84 % d'eau, 13,26 % d'azote et 30,04 % de cuivre.

Essai 1. On secoua $\frac{1}{300}$ molécule-gramme (0^{gr},77) du sel cuivrique de la glycolle pendant 4 heures avec 15 cc. d'eau dans une petite fiole. Après filtration (à la température de 20°), on dosa la teneur en azote dans 5 cc. du liquide filtré; trouvé 4^{mgr},29, d'où l'on peut calculer que 1 gr. du sel cuivrique hydraté exige environ 142 cc. d'eau pour se dissoudre à 20°. On secoua de nouveau le sel cuivrique non dissout pendant 4 heures avec 15 cc. d'eau; 5 cc. du filtrat (à 20°) contenaient également 4^{mgr},29 d'azote.

Essai 2. On traita $\frac{1}{300}$ molécule-gramme (1^{gr},09) du sel cuivrique de l'oxyacide de la même manière que le sel de la glycolle dans l'essai 1.

5 cc. du filtrat obtenu en premier lieu (temp. 20^0) contenaient $4^{\text{mgr}},19$ d'azote, 5 cc. du second filtrat (temp. 20^0) contenaient $3^{\text{mgr}},79$ d'azote, d'où il suit qu'il faut respectivement environ 102 et 113 cc. d'eau pour dissoudre 1 gr. du sel cuivrique de l'oxyacide.

Essai 3. $0^{\text{gr}},77$ du sel de la glyocolle + $1^{\text{gr}},09$ de celui de l'oxyacide ont été traités de la même manière que dans les essais 1 et 2 avec 15 cc. d'eau, en tout. 5 cc. du liquide filtré (à 20^0) obtenu en premier lieu, contenaient $16^{\text{mgr}},17$ d'azote (traités séparément dans les essais 1 et 2 : $4^{\text{mgr}},29 + 4^{\text{mgr}},19 = 8^{\text{mgr}},48$ d'azote); 5 cc. du second filtrat contenaient $15^{\text{mgr}},67$ d'azote (essais 1 et 2 : $4^{\text{mgr}},29 + 3^{\text{mgr}},79 = 8^{\text{mgr}},08$ d'azote).

Essai 4. On chauffa $0^{\text{gr}},77$ du sel cuivrique de la glyocolle avec 15 cc. d'eau dans une éprouvette pendant une demi-heure, avec dissolution presque totale; par refroidissement le tout se figea en une heure et prit la consistance d'une bouillie. 5 cc. du filtrat (à 17^0) contenaient $4^{\text{mgr}},10$ d'azote; par conséquent, 1 gr. du sel exige à cette température env. 149 cc. d'eau pour sa dissolution.

Essai 5. On traita $1^{\text{gr}},09$ du sel cuivrique de l'oxyacide comme le sel de la glyocolle dans l'essai 4 et il s'est comporté de la même manière que celui-ci. 5 cc. du liquide filtré (à 17^0) contenaient $5^{\text{mgr}},30$, d'où il suit qu'il faut environ 81 cc. d'eau pour dissoudre à cette température 1 gr. du sel en jeu.

Essai 6. On chauffa $0^{\text{gr}},77$ du sel cuivrique de la glyocolle et $1^{\text{gr}},09$ de celui de l'oxyacide ensemble dans une éprouvette avec 15 cc. d'eau, ce qui fit dissoudre le tout en une demi-heure. Refroidi, le liquide resta limpide; ce n'est qu'après 4 heures de repos que l'on put constater un commencement de cristallisation. Après abandon jusqu'au lendemain, on trouva dans 5 cc. du liquide filtré $43^{\text{mgr}},70$ d'azote (traité séparément dans les essais 4 et 5 : $4^{\text{mgr}},10 + 5^{\text{mgr}},30 = 9^{\text{mgr}},40$ d'azote).

Pour le sel cuivrique de l'oxyacide les essais n'ont pas donné des résultats tout à fait concordants, probablement parce qu'il faut plus de temps que l'on n'en a employé dans les essais susmentionnés, tant pour produire une solution saturée du sel par agitation avec de l'eau à la température ambiante, que pour porter une solution sursaturée à séparer tout l'excédant du sel dissous. Toutefois il résulte évidemment de ces expériences, premièrement qu'à la température ambiante 1 gr. du sel cuiv-

rique de l'oxyacide demande pour sa dissolution 100 cc. environ d'eau, en second lieu que les sels cuivriques de l'oxyacide et de la glyccocolle augmentent réciproquement et à un degré très considérable la solubilité l'un de l'autre dans l'eau, comme j'avais l'intention de le constater.

3. Transformation de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique en acide pyrrolidine- α -carbonique.

Avant d'exposer les essais que j'ai effectués en vue d'éclaircir les conditions dans lesquelles se fait la transformation de l'oxyacide aminé en acide pyrrolidinecarbonique, je vais décrire ici la méthode dont je me suis servi pour déceler et doser par approximation de petites quantités d'acide pyrrolidinecarbonique en présence de fortes proportions d'oxyacide. J'ai utilisé à cet effet la manière différente dont se comportent les deux acides vis-à-vis de l'alcool et vis-à-vis de l'acide phosphotungstique. Nous avons vu dans la partie précédente de ce mémoire (v. p. 153) que l'alcool absolu agissant sur un mélange des deux composés, en extrait la presque totalité de l'acide pyrrolidinecarbonique, tandis qu'il ne dissout que des quantités fort minimes de l'oxyacide.

Les essais ci-dessous mettent en évidence la manière dont les deux corps se comportent vis-à-vis d'une solution d'acide phosphotungstique (désignée ci-dessous comme »P-T«) dont la concentration était telle que 1 cc. correspondît à 10 mgr. d'azote.

No. 1. Une solution aqueuse à 5 % d'oxyacide pur (v. p. 173) additionnée de P-T, ne donna pas de dépôt: 0^{gr},2 d'oxyacide pur pouvaient même être dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T (c'est-à-dire un peu plus de P-T que la proportion correspondant à l'azote). Même après plusieurs heures de repos, interrompu par des agitations fréquentes, le liquide conservait sa limpidité; mais laissé jusqu'au lendemain, il montrait presque toujours un commencement de cristallisation, qui par frottement allait en augmentant. Un examen microscopique révéla que le dépôt qui s'était formé était constitué exclusivement par des cristaux aciculaires qui, lorsque la cristallisation s'opérait au repos, prenaient l'aspect de faisceaux d'aiguilles assez épaisses. Ce dépôt, une fois formé, était assez peu soluble dans l'eau, mais très soluble dans l'alcool.

No. 2. Une solution de 0^{gr},05 d'acide pyrrolidinecarbonique

pur (contenant 1 molécule d'eau) dans 10 cc. d'eau, additionnée de 1 cc. P-T et frottée avec une spatule, ne tarda pas à séparer un précipité blanc composé, ainsi que le montra l'examen microscopique, exclusivement de prismes courts et épais, quadrilatères ou hectoédriques, rappelant souvent les cristaux de spath calcaire (désigné ci-dessous comme »caractéristique«).

No. 3. Une solution de 0^{gr},025 d'acide pyrrolidinecarbonique pur dans 10 cc. d'eau, additionnée de 1/2 cc. de P-T, ne donna pas de dépôt au bout d'une heure; mais l'abandon jusqu'au lendemain produisit un dépôt assez abondant et possédant l'aspect caractéristique.

En présence de l'oxyacide, la réaction n'est pas tout à fait aussi nette, et il faut ajouter une quantité de P-T suffisante pour convertir en sel phosphotungstique la plus grande partie de l'oxyacide; sans cela, l'acide pyrrolidinecarbonique ne se précipite pas, à moins qu'il n'y soit en proportion abondante.

No. 4. Une solution de 0^{gr},1 d'oxyacide + 0^{gr},05 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau additionnée de 1 cc. de P-T, ne donna pas de dépôt en une heure; par contre, avec 2 cc. de P-T, il se produisit en beaucoup moins de temps un abondant dépôt caractéristique.

No. 5. Une solution de 0^{gr},1 d'oxyacide + 0^{gr},025 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, ne donna qu'après repos jusqu'au lendemain avec 2 cc. de P-T un assez abondant dépôt caractéristique.

No. 6. Une solution de 0^{gr},2 d'oxyacide + 0^{gr},05 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, ne donna avec 3 cc. de P-T un dépôt caractéristique qu'au bout de 12 heures de repos.

No. 7. Une solution de 0^{gr},2 d'oxyacide + 0^{gr},075 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau donna, avec 3 cc. de P-T, au bout d'une demi-heure un abondant dépôt caractéristique.

No. 8. Une solution de 0^{gr},2 d'oxyacide + 0^{gr},1 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, dans laquelle on fit tomber 1 cc. de P-T, fournit un dépôt à l'endroit où tomba la goutte; mais quand on secoua, ce dépôt rentra en dissolution et, en dépit d'agitation constante, une heure se passa avant que la cristallisation commençât; des gouttes ultérieures de P-T produisirent tout de suite un abondant précipité caractéristique. On put reconnaître que 2 cc. de P-T avaient précipité la presque totalité de l'acide

pyrrolidinecarbonique; car après abandon jusqu'au lendemain, suivi d'une filtration et d'une addition d'encore 1 cc. de P-T, on ne put constater, au bout de 8 heures, qu'un dépôt insignifiant.

No. 9. Une solution de 0^{gr},2 d'oxyacide + 0^{gr},25 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, à laquelle on ajouta, goutte à goutte, 1 cc. de P-T, fournit un dépôt là où tombait la goutte; mais l'agitation de la solution fit redissoudre ce dépôt, et quand on ajoutait encore des gouttes de P-T, le dépôt ne se redissolvait que partiellement, et le reste s'est déposé à l'état huileux. Cependant l'huile ne fut que quelques secondes avant de se cristalliser, après quoi le dépôt se précipita aussitôt à l'état cristallin et possédant l'aspect caractéristique. 4 cc. de P-T purent précipiter la totalité de l'acide pyrrolidinecarbonique, tandis que 3 cc. n'y suffisaient pas.

No. 10. Une solution aqueuse de 3 gr. d'oxyacide ayant été évaporée à siccité, le résidu fut traité par l'alcool, d'abord à froid, puis à chaud et sur le filtre. Le reste non dissous dans l'alcool pesait 2^{gr},9. Le résidu d'évaporation de la solution alcoolique pesait 0^{gr},07. Dissous dans 10 cc. d'eau, il ne donna de dépôt ni par addition de 1 cc., ni par celle de 2 cc. de P-T, même pas après plusieurs jours de repos.

No. 11. 3 gr. d'oxyacide + 0^{gr},025 d'acide pyrrolidinecarbonique furent soumis au même traitement que je viens de décrire. Le résidu non dissous dans l'alcool pesait 2^{gr},9. Le résidu d'évaporation de l'extraction alcoolique pesait 0^{gr},1. Dissous dans 10 cc. d'eau et additionné de 2 cc. de P-T, puis laissé en repos jusqu'au lendemain, il fournit un joli dépôt du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique et qui montrait l'aspect caractéristique.

En me basant sur ces essais, je me suis servi du procédé suivant pour rechercher et doser approximativement de petites quantités d'acide pyrrolidinecarbonique existant à côté de fortes proportions d'oxyacide: Après avoir débarrassé de matières étrangères (acides chlorhydrique et sulfurique, hydroxyde de baryum, etc.) le mélange d'oxyacide et d'acide pyrrolidinecarbonique, on a évaporé à consistance de bouillie claire la solution des deux acides. Le reste, solidifié par refroidissement, fut bien trituré à l'alcool absolu, puis filtré, après quoi on a lavé le résidu trois fois à l'alcool absolu chaud. Le reste non dissous fut pesé et considéré comme de l'oxyacide, et la solution alcoolique fut diluée

avec de l'eau, puis évaporée à sec dans une capsule tarée à l'avance. On pèse le résidu, puis le dissout dans 10 cc. d'eau. En agitant constamment la solution, on y fait tomber 1 cc. de P-T, ce qui, en présence d'acide pyrrolidinecarbonique, donne toujours naissance à un précipité huileux qui, par suite des impuretés qu'il contient, est toujours plus ou moins foncé et qui, agité, ne peut pas entrer en dissolution, ce qu'il peut par contre quand on met en œuvre des substances pures. Remué, le dépôt huileux forme une masse visqueuse qui, abandonnée et additionnée d'un peu plus de P-T, ne tarde pas à devenir cristalline. Le liquide surnageant étant devenu limpide, on y fait tomber avec précaution une goutte de P-T, afin de voir si la précipitation continue; dans ce cas on verse encore 1 cc. de P-T dans la solution, et le précipité ainsi formé est alors ordinairement cristallin. On continue de cette manière jusqu'à ce que l'addition d'une goutte de P-T ne donne plus de précipité tout de suite. Alors on laisse reposer le tout pendant une heure, en agitant fréquemment; puis on filtre et additionne le liquide filtré de 1 cc. de P-T. Si alors dans le courant d'une heure il se forme un dépôt caractéristique et bien net du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique, on filtre de nouveau et ajoute encore 1 cc. de P-T, et ainsi de suite, jusqu'à ce qu'une nouvelle addition de P-T ne provoque plus la formation du dépôt caractéristique (constitué de cristaux prismatiques courts et épais, voir p. 169). On peut alors considérer comme précipité la totalité de l'acide pyrrolidinecarbonique, et l'on peut juger de la quantité de celui-ci par la dose de P-T exigée pour la précipitation complète, en ne comprenant pas dans le compte le centimètre cube ajouté en dernier lieu, et qui n'a pas donné de précipité, et en défalquant toujours 1 cc. de P-T, qui peut être regardé comme correspondant à la proportion peu considérable d'oxyacide.

J'ai toujours examiné bien exactement au microscope l'aspect des précipités, et n'y ai jamais rencontré de cristaux aciculaires (sel phosphotungstique de l'oxyacide, voir p. 168); d'un autre côté, il a pu arriver que le précipité n'a pas présenté l'aspect caractéristique décrit plus haut. J'ai alors tenté de faire recristalliser le précipité dans de l'eau, mais en opérant ainsi je n'ai jamais réussi à produire les cristaux, faciles à reconnaître, du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique, composé qui à l'état pur se recristallise aisément. Par conséquent, dans tous

les cas où le précipité n'offrait pas l'aspect caractéristique¹⁾, comme aussi dans ceux où, même après abandon jusqu'au lendemain, aucun dépôt n'avait pris naissance, j'ai considéré l'oxyacide en question comme exempt d'acide pyrrolidinecarbonique ou, plus exactement, comme renfermant moins de 25 mgr. environ de cet acide (comp. essai no. 11, p. 170).

Les recherches que je vais exposer et que j'ai faites à l'occasion de la recristallisation de l'oxyacide, démontreront, je crois, que l'oxyacide employé dans les essais ci-dessus était bien exempt d'acide pyrrolidinecarbonique.

La différence entre la teneur en azote de l'oxyacide et celle de l'acide pyrrolidinecarbonique déshydraté, est inférieure à 2 %. La différence entre les teneurs en carbone atteint à peu près 7 %. En conséquence, une analyse élémentaire ne saurait déceler une proportion inférieure à 2 ou 3 % d'acide pyrrolidinecarbonique dans l'oxyacide, et dans un dosage d'azote le pourcentage décelable de ladite impureté est plutôt moindre encore. L'épreuve qualitative mentionnée précédemment (v. p. 168) et d'après laquelle 0^{gr},2 d'oxyacide doivent se dissoudre à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T, n'est pas non plus assez sensible pour déceler des quantités minimales d'acide pyrrolidinecarbonique; mais, d'un autre côté, elle est excellente quand il s'agit de prouver par tâtonnements la présence dans l'oxyacide non seulement d'acide pyrrolidinecarbonique, mais encore de glyocolle (comp. p. 165). En revanche, l'autre méthode décrite plus haut est beaucoup plus précise: elle permet même d'établir l'existence de moins de 1 % d'acide pyrrolidinecarbonique dans l'oxyacide (p. 170, essais nos 10 et 11). Il est évident que l'application de cette épreuve, jointe à la recristallisation de quantités considérables d'oxyacide, permettra de révéler la présence d'une teneur encore moindre en acide pyrrolidinecarbonique, étant donné que celui-ci, qui peut être extrait même par l'alcool absolu, restera dans l'eau-mère lorsqu'on fait recristalliser l'oxyacide dans l'alcool à 80 %. La recristallisation de 20 gr. d'oxyacide obtenu par le procédé décrit précédemment, c'est-à-dire au moyen de sel cuivrique recristallisé (v. p. 161), a alors produit en premier lieu 14^{gr},7 d'oxyacide recristallisé (v. p. 162). En chassant l'alcool de l'eau-mère

¹⁾ Ces cas ne se produisaient que lorsque la quantité de P-T mise en œuvre était fort peu considérable, et même alors ils étaient assez rares.

dans le vide, dissolvant le résidu dans de l'eau, évaporant la solution au bain-marie jusqu'à consistance de bouillie, triturant et lavant cette masse à l'alcool absolu, d'abord à froid, puis à chaud, on put obtenir encore 5 gr. d'oxyacide, tandis qu'évaporés à siccité, les extraits alcooliques laissaient un résidu pesant 0^{gr},2 et dans lequel on pouvait bien, à l'aide de P-T, reconnaître l'existence d'acide pyrrolidinecarbonique, mais en proportions tellement minimes que sa teneur en azote n'a pu atteindre que quelques peu milligrammes. J'ai eu un résultat tout à fait analogue en faisant recristalliser 20^{gr},8 d'oxyacide (récupérés pour la majeure partie dans les essais faits en vue de convertir l'oxyacide, en acide pyrrolidinecarbonique en traitant par un acide, par étherification etc.): le rendement était de 14^{gr},8 + 5^{gr},6 d'oxyacide, et la solution alcoolique fournissait un résidu pesant 0^{gr},23 et renfermant une trace d'acide pyrrolidinecarbonique. En faisant observer que seul l'acide oxyaminé recristallisé (c'est-à-dire, dans les deux essais ci-dessus indiqués, respectivement les 14^{gr},7 et les 14^{gr},8) a servi tant pour les recherches exposées au début de ce chapitre que pour les essais décrits ci-après de transformation de l'oxyacide en acide pyrrolidinecarbonique, je crois être en droit de tirer cette conclusion qu'on peut regarder ledit oxyacide recristallisé comme exempt d'acide pyrrolidinecarbonique.

a. Traitement de l'oxyacide par l'acide chlorhydrique ou par l'hydroxyde de baryum.

Essai n° 1. Une solution de 3 gr. d'oxyacide dans 200 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal, fut évaporée au bain-marie en 3 heures. Puis j'y ai ajouté de nouveau 200 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal et évaporé encore. Finalement, cette opération a été répétée pour la troisième fois. Déjà après la première évaporation en présence d'acide chlorhydrique, un petit échantillon prélevé et dilué d'un peu d'eau, a donné avec P-T un précipité abondant.

Le résidu d'évaporation dissous dans de l'eau, fut débarrassé d'acide chlorhydrique au moyen de carbonate d'argent, et la solution privée d'argent et renfermant une proportion fort minime d'acide chlorhydrique, fut évaporée et soumise au traitement décrit à la p. 170.

2^{gr},6 d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T). La solution

alcoolique laissa un résidu du poids de $0^{\text{gr}},3$; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue répondait à environ 2 cc. de P-T ou à environ 20 mgr. d'azote (le 3^{ième} cc. de P-T donna encore du dépôt, le 4^{ième} non (v. p. 171).

Il ressort donc que dans cet essai environ 6 % de la quantité d'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique.

Essai n° 2. 3 gr. d'oxyacide furent traités comme je viens de l'indiquer, à cette différence près que l'acide chlorhydrique 5-normal à été remplacé par la même quantité d'acide chlorhydrique concentré.

$2^{\text{gr}},3$ d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool absolu ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu du poids de $0^{\text{gr}},5$; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue, répondait à environ 4 cc. de P-T ou à 40 mgr. environ d'azote.

Il ressort donc que dans cet essai environ 13 % de la quantité d'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique.

Essai n° 3. 3 gr. d'oxyacide furent dissous dans 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré, qui se trouvaient dans un ballon de $\frac{3}{4}$ l. Puis, on a chauffé pendant 3 heures dans le bain d'huile, dont la température s'éleva graduellement jusqu'à 150° . Après évaporation dans une capsule au bain-marie, le résidu fut repris par 100 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et la solution fut de nouveau évaporée au bain-marie. Ces opérations terminées, on soumit au même traitement que dans l'essai n° 1.

$1^{\text{gr}},75$ d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool absolu ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu du poids de $1^{\text{gr}},1$; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue répondait à environ 10 cc. de P-T, soit à 100 mgr. environ d'azote.

Il ressort donc que dans cet essai 32 % environ de l'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique.

Quand on chauffe l'oxyacide en présence d'acides chlorhydrique ou sulfurique fort étendus, il ne se forme pas d'acide pyrrolidinecarbonique (voir les essais nos 7 et 8, p. 180).

Essai n° 4. On traita 3 gr. d'oxyacide dans un ballon de 1 l., renfermant 40 gr. d'hydroxyde de baryum cristallisé et 100 cc.

d'eau, en chauffant au bain-marie pendant 32 heures. Après avoir ajouté encore 20 gr. de baryte et 50 cc. d'eau, et après un chauffage ultérieur durant 32 heures, j'ai éliminé tout le baryum avec un excès aussi petit que possible d'acide sulfurique. Finalement, le filtrat du sulfate de baryum a été évaporé et traité comme à l'ordinaire.

2^{gr},7 d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool absolu (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T); la solution alcoolique laissa un résidu qui pesait 0^{gr},3 et qui, dissous à l'eau, ne donna pas de précipité avec P-T, de sorte que dans cet essai il ne s'est pas formé d'acide pyrrolidine-carbonique. L'action de l'hydroxyde de baryum sur l'oxyacide n'a pas non plus fait perdre des quantités notables d'azote, car la solution aqueuse des 0^{gr},3 contenaient environ 28 mgr. d'azote ($3 \text{ gr.} \div 2^{\text{gr}},7 = 0^{\text{gr}},3$ d'oxyacide contiennent 31^{mgr},65 d'azote).

Le sel phosphotungstique, obtenu dans les essais nos 1, 2 et 3, de l'acide pyrrolidinecarbonique, fut rassemblé, puis lavé à l'eau froide. Ensuite, j'ai éliminé l'acide phosphotungstique et précipité encore une fois l'acide pyrrolidinecarbonique à l'état de sel phosphotungstique. Cela fait, l'acide pyrrolidinecarbonique obtenu à partir de ce dernier précipité, fut transformé en sel cuivrique. (Pour le mode opération, voir p. 154 et 157). J'ai obtenu 1^{gr},0 de sel cuivrique cristallisant comme auparavant en belles tables rhomboïdales caractéristiques, et qui cependant, soumis au lavage à l'alcool absolu, demeura assez longtemps en contact avec celui-ci et, par suite, céda un peu de son eau de cristallisation¹⁾, en changeant de couleur. L'eau-mère a fourni encore 0^{gr},2 de sel cuivrique presque pur, mêlé seulement à un peu de sulfate de cuivre.

0^{gr},9544 de sel cuivrique séché à l'air, furent placés dans le vide à 70°, et abandonnèrent en 48 heures seulement 0^{gr},0814 (8,53 %), alors que le sel cuivrique hydraté doit contenir 10,99 % d'eau. J'ai donc exposé le reste sec, pesant 0^{gr},8730, au-dessus d'eau pendant 48 heures, puis à l'air, jusqu'à poids constant. Il avait alors absorbé 0^{gr},1077 d'eau, correspondant à 10,98 % du poids du sel hydraté ($0^{\text{gr}},9807 = 0^{\text{gr}},8730 + 0^{\text{gr}},1077$).

0^{gr},2295 de ce dernier sel ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 19^{cc},55 d'hyposulfite (8,52 % d'azote, calculé: 8,57 %).

¹⁾ Ceci expliquera peut-être la teneur peu élevée en eau (9.79 %) d'un sel cuivrique, pur à part cette eau, préparé par E. Fischer (Zeitsch. physiol. Ch. 33, 413 [1901]) au moyen de l'acide pyrrolidine- α -carbonique racémique, qu'il avait obtenu par scission d'albumine d'oeuf.

Le petit essai ci-après démontre que, traité par l'alcool absolu, un sel cuivrique de composition tout à fait normale cède des quantités notables d'eau. Sur 1 gr. du sel cuivrique mentionné plus haut (v. p. 157) de l'acide pyrrolidinecarbonique (contenant 10,95 % d'eau et 8,51 % d'azote) et que j'avais placé dans une petite capsule, j'ai versé 25 cc. d'alcool absolu. Après avoir agité quelques minutes, il se produisit un changement de couleur bien prononcé: du bleu pur au violet de plus en plus foncé. Ayant agité fréquemment pendant une demi-heure, on filtra, et le sel fut lavé une fois à l'alcool absolu, puis à l'éther; finalement il subit une dessiccation rapide à l'air. A la suite de ce traitement, le poids était d'environ 0^{gr},9. J'ai trouvé une teneur en azote du sel anhydre de 9,22 % et, par conséquent, il n'y a pas eu déshydratation complète (le calcul avait donné une teneur en azote du sel anhydre de 9,62 %). Aussi, placé au-dessus d'eau, puis exposé à l'air jusqu'à poids constant, le sel a-t-il absorbé de nouveau 8,66 % d'eau, ce qui donne une teneur en azote du sel hydraté de

$$\frac{9,22 \times 100}{108,66} = 8,49 \text{ (la substance initiale contenait 8,51 \% d'azote.)}$$

b. Dédoublément du produit de benzylation de l'oxyacide à l'aide des acides chlorhydrique ou sulfurique. Si l'on prend à tâche de rechercher l'acide α -amino- δ -oxyvalérique ou des oxyacides aminés semblables dans un mélange de divers acides aminés, formé dans une scission ordinaire de matière protéique, on se trouve actuellement assez embarrassé. Comme on l'a dit dans l'introduction, il est vrai qu'on a réussi, à l'aide de la »méthode par éthérification« de E. Fischer; à isoler la sérine des produits de décomposition d'une grande série de protéines; mais déjà la sérine, terme le plus bas du groupe des acides oxyaminés, se trouve dans les fractions bouillant à la température la plus élevée des éthers-sels des acides aminés et, par conséquent, il est fort probable que les éthers-sels des termes plus élevés de la série des oxyacides aminés ne se laissent distiller que très difficilement; l'essai décrit dans la dernière partie du présent chapitre (v. p. 181) confirme cela en ce qui concerne l'acide α -amino- δ -oxyvalérique.

On est alors tenté d'essayer l'isolation des acides oxyaminés à l'aide de produits de substitution convenables, qui pourraient à leur tour fournir les acides eux-mêmes.

C'est pourquoi j'ai pensé qu'il y aurait intérêt à apprendre à connaître les propriétés du produit benzoylé de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique, et surtout à essayer s'il y avait possibilité, par scission au moyen d'acides très étendus, de regagner l'oxyacide sans qu'il se produise en même temps des quantités trop importantes d'acide pyrrolidine- α -carbonique.

$1/20$ molécule-gramme d'oxyacide (6^{gr},66) a été benzoylé en réfrigérant constamment à la glace et secouant à peu près comme cela a été indiqué pour l'acide α - δ -diaminovalérique¹⁾, avec le triple de la quantité calculée de chlorure de benzoyle ajouté par 10 portion égales. En même temps on a ajouté une solution d'hydroxyde de baryum de manière que la réaction fût toujours nettement alcaline (quantités totales employées: 21 gr. de chlorure de benzoyle et 800 cc. d'eau de baryte saturée à froid). Après repos jusqu'au lendemain, on a séparé par filtration une petite quantité d'une impureté huileuse (contenant un total de 38 mgr. d'azote), après quoi le liquide filtré alcalin a été refroidi à la glace et précipité par 50 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal. L'acide benzoïque ainsi précipité pesait à l'état lavé et séché à l'air 9^{gr},9 et renfermait, en tout, seulement 6 mgr. d'azote. Le reste de l'acide benzoïque libre a été extrait de la solution en la secouant avec de l'éther. On a obtenu ainsi 3^{gr},05 d'acide benzoïque renfermant, en tout, 45 mgr. d'azote et qui, partant, n'était pas pur; en traitant ces 3 gr. d'acide benzoïque impur par de petites doses successives d'éther, on a pu extraire l'acide benzoïque, et il restait une masse huileuse incristallisable et formée vraisemblablement du dérivé benzoylé de l'oxyacide.

La solution dépourvue d'acide benzoïque libre, fut rendue très faiblement alcaline à l'aide d'eau de baryte, puis évaporée au bain-marie jusqu'à consistance de bouillie claire. Cette masse refroidie à la glace et triturée avec un pistille, fut traitée par environ 20 fois son volume d'alcool absolu. Après 3 heures de séjour dans de l'eau glacée, le chlorure de baryum (47^{gr},2 avec, en tout, 5 mgr. d'azote) est séparé par filtration, puis soigneusement lavé à l'alcool absolu. On distille l'alcool de la solution alcoolique dans le vide, dissout le résidu dans de l'eau et évapore la solution aqueuse au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse. Refroidie dans l'eau glacée, la masse devient pâteuse, sans toute-

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 45 (1902).

fois se cristalliser nettement. Délayée dans de l'alcool, la masse sirupeuse se dissout facilement, bien qu'un peu lentement (employé 100 + 50 cc. d'alcool absolu); il reste un peu de chlorure de baryum qui, lavé à l'alcool absolu et séché à l'air, accuse un poids de 0^{gr},75 et renferme en tout 2 mgr. d'azote.

On verra plus loin que la solution alcoolique renferme le sel de baryum de l'acide α -benzoylamino- δ -oxyvalérique, sel qui, par conséquent, n'a été obtenu ici que sous forme d'une masse sirupeuse soluble dans l'alcool absolu. La solution contenait en tout 594 mgr. d'azote; comprenant dans le compte les teneurs en azote des précipités mentionnés précédemment ($38 + 6 + 45 + 5 + 2 = 96$ mgr.), nous arrivons à une teneur totale en azote de 690 mgr. (La matière première en contenait $\frac{1}{20} \times 14040 = 702$ mgr.).

A l'aide d'une portion minime de sulfate d'argent et d'une quantité convenable d'acide sulfurique étendu, la solution alcoolique du sel de baryum fut dépourvue de la majeure partie de son chlore et de tout son baryum, de sorte que, outre l'acide α -benzoylamino- δ -oxyvalérique libre, la solution ne renfermait plus qu'une trace d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique. Après dosage de l'azote dans une prise de la solution, on en mesura 2 portions (celles employées dans les essais n^{os} 5 et 6 ci-dessous) contenant chacune 264 mgr. d'azote, correspondant à 2^{gr},5 d'oxyacide; la proportion correspondante de la combinaison benzoylée doit fournir par dédoublement 2^{gr},3 d'acide benzoïque.

L'alcool des deux solutions mesurées fut distillé, sous pression réduite, dans des ballons de la capacité de 1 l., et les résidus huileux, constitués par de l'acide α -benzoylamino- δ -oxyvalérique, furent traités au bain d'eau bouillante respectivement par 50 cc. d'acide chlorhydrique normal (essai n^o 5) et par 50 cc. d'acide sulfurique normal (essai n^o 6). En même temps et dans des conditions tout à fait analogues, 2^{gr},5 d'oxyacide non benzoylé furent chauffés en présence de 50 cc. d'acide chlorhydrique normal (essai n^o 7) ou de 50 cc. d'acide sulfurique normal (essai n^o 8). La durée du chauffage était de 8 heures chaque fois. Ensuite, l'acide benzoïque mis en liberté dans les essais n^{os} 5 et 6 fut extrait à l'aide d'éther, et les extraits étherés furent lavés en secouant avec 2×10 cc. d'acide normal respectivement chlorhydrique et sulfurique, puis évaporés à siccité dans une capsule pesée d'avance, la chaleur étant aussi faible que possible. L'acide chlorhydrique

ou sulfurique ayant servi au lavage de l'éther, fut ajouté à la solution principale (resp. l'essai n° 5 et l'essai n° 6), et en même temps on ajouta une quantité correspondante d'acide chlorhydrique ou sulfurique aux deux portions d'oxyacide non benzoylé (essais n° 7 et 8), puis on chauffa de nouveau pendant 8 heures, et ainsi de suite, jusqu'à ce que, dans les essais sur l'oxyacide benzoylé, le liquide après un chauffage renouvelé ne cédât plus d'acide benzoïque à l'éther. On a constamment contrôlé le volume du liquide, de même qu'en ajoutant de temps en temps un peu d'eau, on a pris soin que la concentration de l'acide variât aussi peu que possible. Finalement, l'acide chlorhydrique ou sulfurique ayant été précipité de la manière habituelle, on évapora la solution à sec, et rechercha par la méthode précédemment décrite, si le résidu contenait de l'acide pyrrolidine-carbonique (voir p. 170).

Comme on devait s'y attendre, l'action dédoublante de l'acide chlorhydrique normal fut plus rapide que celle de l'acide sulfurique. En effet, après 8 heures de chauffage en présence de l'acide chlorhydrique, toute l'huile avait disparu, alors que dans le cas de l'acide sulfurique il se passait 2×8 heures (comparez aussi les quantités d'acide benzoïque extraites).

Essai n° 5. Le dérivé benzoylé de 2^{gr},5 d'oxyacide fut soumis pendant 6×8 heures à l'action de la chaleur en présence d'acide chlorhydrique normal. L'acide benzoïque obtenu pesait: $1,30 + 0,45 + 0,25 + 0,15 + 0,08 + 0,02 = 2^{\text{gr}},25$ (calculé: 2^{gr},3). Pendant l'évaporation de la solution privée de son acide chlorhydrique, l'odeur caractéristique de pyrrolidine se faisait sentir très nettement. Poids du résidu d'évaporation 2^{gr},44, dont par le traitement à l'alcool absolu 2^{gr},26 d'oxyacide sont restés indissous (0^{gr},2 de l'oxyacide se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu pesant 0^{gr},17 et qui, traité par 1 cc. de P-T, donna un abondant précipité huileux sans les cristaux caractéristiques du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique; en additionnant de nouveau de P-T, on n'obtint plus de précipité, d'où il faut conclure à la présence d'une trace seulement d'acide pyrrolidine-carbonique.

Essai n° 6. Le dérivé benzoylé de 2^{gr},5 d'oxyacide fut chauffé pendant 7×8 heures en présence d'acide sulfurique normal. L'acide benzoïque obtenu pesait: $0,75 + 0,50 + 0,40 +$

$0,30 + 0,23 + 0,10 + 0,04 = 2^{\text{gr}},32$. Pendant l'évaporation de la solution débarrassée d'acide sulfurique, on percevait une forte odeur de pyrrolidine. Le résidu d'évaporation pesait $2^{\text{gr}},40$. Insolubles dans l'alcool absolu restaient $2^{\text{gr}},10$ d'oxyacide ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un reste pesant $0^{\text{gr}},28$ et qui se comportait tout à fait comme celui de l'essai n° 5.

Essai n° 7. $2^{\text{gr}},5$ d'oxyacide furent chauffés pendant, en tout, 6×8 heures avec de l'acide chlorhydrique normal. Pendant l'évaporation de la solution débarrassée d'acide chlorhydrique, l'odeur de pyrrolidine ne se faisait pas sentir. Le résidu d'évaporation pesait $2^{\text{gr}},45$, dont le traitement par l'alcool absolu a laissé indissous $2^{\text{gr}},35$ d'oxyacide ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un reste pesant $0^{\text{gr}},1$ et qui, traité par P-T, donna un précipité fort minime sans cristaux de sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique.

Essai n° 8. $2^{\text{gr}},5$ d'oxyacide furent soumis pendant 7×8 heures à l'action de la chaleur en présence d'acide sulfurique normal. Pendant l'évaporation de la solution privée de son acide sulfurique l'odeur de pyrrolidine ne se faisait pas sentir. Le reste d'évaporation pesait $2^{\text{gr}},50$. Insoluble dans l'alcool absolu étaient $2^{\text{gr}},45$ d'oxyacide ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu pesant $0^{\text{gr}},05$ et qui ne donna pas de précipité avec P-T).

Essai n° 9. Le dérivé benzoylé de 5 gr. d'oxyacide (préparé de la même manière que celui qui servait aux essais nos 5 et 6) fut dédoublé par chauffage pendant $2 + 1$ heures, en présence de $200 + 100$ cc. d'acide chlorhydrique concentré, dans un ballon de 1 l. placé dans le bain d'huile, dont on éleva peu à peu la température vers 150° . Malheureusement, on perdit par accident la majeure partie de la substance; néanmoins on put constater, presque avec certitude, que ce traitement avait transformé en acide pyrrolidinecarbonique 30 à 40 % de l'oxyacide employé. L'acide pyrrolidinecarbonique ainsi formé fut précipité à l'état de sel phosphotungstique, qu'on décomposa par le procédé ordinaire, après quoi l'acide fut reprécipité par P-T. De ce précipité j'ai tiré l'acide pyrrolidinecarbonique, qui alors m'a fourni le sel cuivrique sous la forme de feuillets caractéristiques rhomboïdaux d'une belle couleur bleue.

0^{gr},1323 de sel cuivrique séché à l'air, cédèrent dans le vide, à 70°, 0^{gr},0146 d'eau (11,04 %; calculé 10,99 %), puis au dosage de l'azote donnèrent de l'ammoniaque correspondant à 11^{cc},33 d'hypo-sulfite (8,56 % d'azote; calculé 8,57 %).

Il ressort des essais nos 5—9 que par une ébullition prolongée en présence d'acide chlorhydrique ou sulfurique très faible, le dérivé benzoylé de l'oxyacide peut se dédoubler complètement sans qu'il se forme plus d'une trace d'acide pyrrolidinecarbonique. Dédoublé au moyen d'acide chlorhydrique concentré, un tiers environ de l'oxyacide se convertit en acide pyrrolidinecarbonique, c'est-à-dire une quantité semblable à celle que donne le traitement de l'oxyacide pur par ébullition en présence d'acide chlorhydrique fort.

c. Éthérification de l'oxyacide. Comme nous l'avons mentionné plus haut (v. p. 176), il y aura grand intérêt à savoir d'une manière exacte comment l'oxyacide se comporte dans l'éthérification, suivie d'une distillation dans le vide de l'éther-sel libre, par le procédé indiqué par E. Fischer¹⁾ et qu'il a employé avec tant de succès. C'est dans le but d'éclaircir cette question que j'ai effectué l'essai n° 10 que voici.

Sur 15 gr. d'oxyacide se trouvant dans un ballon de 1 l., on verse 100 cc. d'alcool absolu, et sans réfrigérer on y conduit du chlorure d'hydrogène sec jusqu'à ce que celui-ci commence à passer inabsorbé. On fait subir à la solution limpide et chaude encore un chauffage d'un quart d'heure au bain-marie, puis une évaporation dans le vide jusqu'à consistance huileuse. Ensuite, on reprend par 100 cc. d'alcool absolu et sature, en réfrigérant à la glace, de chlorure d'hydrogène sec, ce qui fait déposer au fond du ballon une huile visqueuse, constituée vraisemblablement par du chlorhydrate de l'éther oxyaminé et qui, par chauffage au bain-marie pendant 1/4 d'heure, se redissout complètement. On distille alors l'alcool dans le vide aussi complètement que possible, à une température ne dépassant pas 40°, et l'on étend l'huile restante par environ la moitié de son volume d'eau. Enfin on prélève un échantillon (marqué »Échantillon I«, v. p. 182).

On verse dans le reste de la solution 300 cc. d'éther, puis refroidit bien dans un mélange de sel marin et de glace. Cela

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 33, 153 (1901).

fait, on ajoute, en agitant soigneusement, des doses successives d'une solution également bien refroidie d'une partie d'hydroxyde de sodium dans deux parties d'eau. Une réaction fortement alcaline s'étant manifestée, on ajoute une solution saturée et refroidie de carbonate de potassium, ainsi que du carbonate de potassium solide, en secouant et refroidissant constamment dans le mélange réfrigérant. On décante la couche étherée surnageante et secoue de nouveau avec 3×150 cc. d'éther, après une addition renouvelée d'un peu de lessive de soude et de carbonate de potassium, et en faisant refroidir toujours bien soigneusement. On abandonne à elle-même la masse insoluble à l'éther (désignée dans la suite par »R.«, v. p. 184), et on sèche rapidement les extraits étherés en secouant avec du carbonate potassique solide, déliquescent d'abord, mais qu'on peut finalement, en agitant, réduire en poudre fine. Après avoir séparé celle-ci par filtration et lavé deux fois à l'éther sec, on laisse reposer le liquide filtré une nuit durant en contact avec du sulfate de sodium fraîchement déshydraté. Après filtration, on distille la majeure partie de l'éther, et retient dans le ballon une partie du résidu, pour servir d'échantillon (»Échantillon II«, v. p. 183), tandis qu'on en transvase la majeure partie dans un petit ballon à fractionner.

Après distillation de l'éther sous la pression de l'atmosphère, on réduit la pression jusqu'à 16 mm., puis chauffe rapidement dans le bain d'huile, en plaçant le récipient dans un mélange réfrigérant. Ce n'est que lorsque la température du bain d'huile s'approche de 150° que commence la distillation; le thermomètre se trouvant dans le col du ballon, marque alors 70° , et monte lentement et régulièrement jusqu'à 103° , en même temps que la température du bain d'huile a atteint 240° . Même encore une fort petite quantité du liquide a passé, et en continuant à chauffer on provoqua la formation de vapeurs blanches dans le ballon, et en même temps la pression commença à augmenter. Ces deux phénomènes sont l'un et l'autre des signes d'un commencement de décomposition avec dégagement gazeux; ils m'amènèrent à interrompre la distillation. J'ai examiné séparément le distillat (désigné dans ce qui suit par »D«, v. p. 183) et le résidu de la distillation (désigné dans ce qui suit par »D. R.«, v. p. 184).

Échantillon I (v. p. 181). On fit dissoudre l'échantillon dans 300 cc. environ d'eau, et saponifia l'éther-sel en chauffant au bain-marie pendant une demi-heure avec un excès d'eau de

baryte. Ensuite on précipita tout le baryum par un excès aussi petit que possible d'acide sulfurique. La solution contenait en tout 216 mgr. d'azote; on en évalua l'acide pyrrolidinecarbonique par le procédé précédemment décrit.

Le résidu de l'évaporation était solide et cristallin; il pesait 2^{gr},05. Après un traitement par l'alcool absolu, 1^{gr},80 d'oxyacide restèrent à l'état indissous (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T), tandis que la solution alcoolique laissait un résidu résineux du poids de 0^{gr},2. La quantité y contenue d'acide pyrrolidinecarbonique répondait à environ 1 cc. de P-T, soit à 10 mgr. environ d'azote. Le sel phosphotungstique présentait le bel aspect caractéristique déjà mentionné.

Il ressort donc que l'éthérification a converti environ 5 % de l'oxyacide en acide pyrrolidinecarbonique.

Échantillon II (v. p. 182) fut soumis au même traitement que le précédent. La teneur totale d'azote était de 136 mgr.

Le reste de l'évaporation, solide et cristallin, pesait 1^{gr},30. En le traitant par l'alcool absolu, on eut 0^{gr},9 d'oxyacide restés indissous (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T), tandis que la solution alcoolique laissa un résidu pesant 0^{gr},35; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue, répondait à environ 2 cc. de P-T, soit à 20 mgr. environ d'azote; ici encore, le sel phosphotungstique avait le bel aspect caractéristique.

Cet échantillon renferme donc environ 15 % de la quantité d'azote à l'état d'acide pyrrolidinecarbonique, le reste à l'état d'oxyacide.

Le distillat D (v. p. 182), bien que sentant l'alcool, laissait nettement percevoir une odeur particulière, hétérogène. Étendu avec de l'eau, il se troubla légèrement, et l'on ne réussit pas à l'éclaircir par filtration. La solution d'une réaction fortement alcaline, fournit au moyen de P-T un précipité soluble dans l'alcool, elle contenait 40 mgr., en tout, d'azote. Du reste, la solution fut soumise au même traitement que l'échantillon I; seulement il faut noter que l'addition de l'eau de baryte provoqua l'apparition d'un précipité blanc, qu'on recueillit et lava. On reconnut qu'il était formé de carbonate de baryum, provenant évidemment de l'acide carbonique auquel, au cours de la distillation, la décomposition de l'oxyacide avait donné naissance.

Le résidu d'évaporation était presque parfaitement cristallin

et avait un poids de $0^{\text{gr}},35$. Il était soluble dans l'alcool absolu même froid, ne laissant que des flocons qu'on ne put peser. La solution alcoolique évaporée redonna les $0^{\text{gr}},35$, dont la teneur en acide pyrrolidinecarbonique répondait à 4 cc. environ de P-T, soit à 40 mgr. d'azote; ici encore, le sel phosphotungstique avait le bel aspect qui le caractérise.

Le distillat D ne renfermait donc d'autre combinaisons azotées que l'acide pyrrolidinecarbonique.

Le résidu de distillation D-R (v. p. 182) constituait une masse brunâtre résineuse, dont la solution aqueuse était un liquide jaune tirant sur le rouge, de réaction très faiblement alcaline. Cette solution contenait, en tout, 275 mgr. d'azote¹⁾ et fournit, au moyen de P-T, un précipité soluble dans l'alcool.

Après avoir chauffé la solution une demi-heure au bain-marie avec 200 cc. d'eau de baryte saturée à froid, on élimina le baryum par un excès aussi petit que possible d'acide sulfurique. On décolora ensuite le liquide filtré avec du noir animal, et puis on évapora la solution, qui alors ne contenait plus que 170 mgr. d'azote, jusqu'à consistance résineuse. Le poids en était de $1^{\text{gr}},5$, dont $0^{\text{gr}},2$ seulement étaient insolubles dans l'alcool absolu. Ces $0^{\text{gr}},2$ ne contenaient à coup sûr pas d'oxyacide; car même dans une solution aqueuse très étendue, le P-T donna un abondant précipité microcristallin difficilement soluble tant dans l'eau chaude que dans l'alcool.

La solution alcoolique laissa une masse huileuse ou sirupeuse du poids de $1^{\text{gr}},3$. Cette dernière était sans doute de constitution hétérogène, mais ne contenait pas d'acide pyrrolidinecarbonique; car la solution aqueuse n'a exigé que 6 cc. de P-T, correspondant à 60 mgr. d'azote, pour être précipitée complètement, alors que dans le liquide filtré du sel phosphotungstique il y avait 56 mgr. d'azote non précipitable par le P-T. Le sel phosphotungstique s'isola immédiatement en masse solide (non pas, comme dans le cas de l'acide pyrrolidinecarbonique, à l'état huileux d'abord), c'est-à-dire sous la forme d'un volumineux dépôt amorphe et sans aspect caractéristique.

La masse R restée non dissoute dans l'éther (v. p. 182)

¹⁾ En outre, il s'était déposé dans le col du ballon une petite quantité d'un joli produit blanc et cristallin de sublimation, à propos duquel je ne saurais rien dire, si ce n'est qu'il est soluble, à réaction neutre, dans l'eau, et que le P-T, réagissant sur la solution aqueuse, donna un précipité soluble dans l'alcool.

fut dissoute dans de l'eau et chauffée une demi-heure au bain-marie pour saponifier l'éther-sel, après quoi l'on neutralisa par l'acide chlorhydrique et concentra fortement la solution, dont la teneur en azote était de 825 mgr. Après avoir ajouté une dose d'acide chlorhydrique un petit peu plus grande que celle qui correspondait à la quantité d'azote, on continua l'évaporation jusqu'à consistance de bouillie, et, refroidissant à la glace, on tritura cette masse à l'alcool absolu. Après avoir étendu d'eau la solution alcoolique et distillé l'alcool dans le vide, on évapora de nouveau jusqu'à consistance sirupeuse ou de bouillie, puis traita par l'alcool absolu, en refroidissant à la glace. On renouvela ce dernier traitement afin d'éliminer le dernier reste de chlorures de potassium et de sodium. Finalement, par le procédé ordinaire au moyen de carbonate d'argent, on enleva l'acide chlorhydrique aux chlorhydrates solubles des acides aminés, et l'on évapora la solution.

Le résidu de l'évaporation, qui était constitué de beaux cristaux, laissa par traitement à l'alcool absolu 7^{gr},3 d'oxyacide (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T), tandis que la solution alcoolique donna un reste brun résineux du poids de 0^{gr},5. Ce reste fut dissous dans 10 cc. d'eau, et la solution précipitée comme précédemment au moyen de P-T. La précipitation en demanda 4 cc. répondant à 40 mgr. d'azote. Mais dans le précipité, même après une recristallisation dans de l'eau, on n'apercevait que quelques rares cristaux ayant la forme caractéristique du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique; le reste du précipité était de structure microcristalline et se dissolvait assez difficilement tant dans l'eau chaude que dans l'alcool.

Ici nous nous trouvons probablement en présence d'un produit de polymérisation de l'oxyacide formé par l'action de la forte lessive alcaline sur l'éther-sel, parce que ce ne fut que 2 ou 3 jours après le traitement par l'éther qu'on procéda à la dissolution dans l'eau et au traitement subséquent.

Comme on l'a dit plus haut, on s'est servi comme matière première dans cet essai, de 15 gr. d'oxyacide, contenant 1583 mgr., en tout, d'azote. Or, il résulte de nos essais que

Échantillon I contient	216 mgr. d'azote
Échantillon II	136 — —
	<hr/> 352 mgr. d'azote

	352 mgr. d'azote		
Distillat D	40	—	—
Reste de distillation D-R	275	—	—
La masse restée insoluble dans l'éther R....	825	—	—
<hr/>			
Total...	1492 mgr. d'azote		

L'analyse de l'échantillon I montre que par l'éthérification même 5 % environ de l'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique, dont, par conséquent, la teneur totale en azote doit être environ $\frac{5}{100} \times 1583 \text{ mgr.} = 79 \text{ mgr.}$ environ. Échantillon I en contient environ 10 mgr., tandis qu'à peu près tout le reste, environ 69 mgr., se trouve dans l'extrait éthéré (Échantillon II: 20 mgr. env. + Distillat D: 40 mgr. env.).

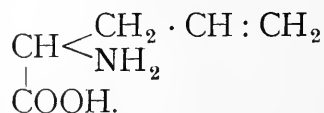
Il ressort donc de cet essai:

1° Qu'une petite portion de l'oxyacide se convertit, par éthérification d'après la méthode de Fischer, en éther pyrrolidinecarbonique.

2° Que, d'un côté, l'éther-sel de l'oxyacide peut difficilement et très incomplètement être extrait au moyen d'éther par le procédé indiqué par Fischer, tandis que l'éther pyrrolidinecarbonique formé simultanément entre presque totalement en solution éthérée.

3° Le chauffage dans le vide d'un mélange des éthers-sels de l'oxyacide et de l'acide pyrrolinecarbonique ne fait distiller que ce dernier éther-sel, tandis que le premier se scinde en cédant l'alcool. Le résidu de la distillation ne contient ni l'oxyacide, ni l'acide pyrrolidinecarbonique¹⁾.

4. Glycocolle allylique.



Le procédé dont j'ai fait usage m'ayant fourni un rendement satisfaisant en glycocolle allylique, je vais le décrire ici; toutefois

¹⁾ Il va de soi que ce que je viens de dire n'est vrai que lorsque la distillation se fait sous une pression d'environ 16 mm. Quant à la question de savoir quelle serait la marche de la distillation sous une pression inférieure à 1 mm., avec réfrigération du récipient au moyen d'air liquéfié, — procédé dont Fischer s'est servi dans ses fractionnements ultérieurs d'éthers aminés, — les faits établis ne permettent de rien affirmer de positif.

il convient de faire remarquer que je n'ai eu occasion de m'en servir qu'une seule fois et que, par conséquent, il est probablement susceptible de modifications et d'améliorations sur plusieurs points. C'est là un bon exemple de la marche facile d'une pareille synthèse au moyen d'éther phtalimidosodomalonique et d'un bromure ou iodure qu'on peut facilement se procurer.

On chauffa $\frac{1}{5}$ molécule-gramme d'éther phtalimido-sodomalonique dans le bain d'huile avec un grand excès d'iodure allylique récemment distillé (employé 240 gr., calculé 34 gr.). Après 3 heures de chauffage à 125° (la température du bain), la réaction paraissait déjà achevée; mais un échantillon prélevé montra que la réaction du dépôt était encore nettement alcaline. On continua alors le chauffage pendant 8 heures, faisant monter lentement la température du bain jusqu'à 140° . Pas même à ce moment-là le dépôt n'avait de réaction tout à fait neutre; mais on put constater que la quantité d'éther phtalimido-sodomalonique inaltéré était très faible; car en traitant la masse par l'éther on obtint un résidu essentiellement constitué d'iodure de sodium et dont la teneur totale en azote était de 10 mgr. seulement.

On distilla l'éther de la solution éthérée, puis l'excès d'iodure allylique fut entraîné par un courant de vapeur d'eau. Ensuite on traita par un peu d'hyposulfite le résidu brun, huileux, insoluble dans l'eau, afin d'éliminer l'iode libre. Le résidu fut dissous dans l'éther et la solution éthérée desséchée au moyen de chlorure de calcium, puis on chassa l'éther, et il resta une huile brunâtre, qu'on ne put faire figer et dont le poids était de 71 gr. (Le poids calculé d' $\frac{1}{5}$ molécule-gramme d'éther allyle-phtalimidomalonique est de 69 gr.).

Un échantillon prélevé donnant par chauffage en présence d'acide sulfurique concentré un développement bien prononcé d'iode, on a extrait à chaud avec $1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{2}$ l. d'éther de pétrole, qui ne dissolvait pour ainsi dire que la combinaison allylique pure; en chassant l'éther de pétrole, on obtint ce composé sous forme d'une huile jaune. Obtenu 62 gr. ou environ 90 % de ce que donne la théorie. On n'y trouvait qu'une trace minime d'iode, et la teneur en azote était de 4,04 %, tandis que le calcul avait indiqué 4,07 %¹⁾.

¹⁾ Le résidu non dissous dans l'éther de pétrole présentait une coloration brune, pesait 8 gr,5 et contenait 3,72 % d'azote avec des quantités appréciables d'iode. Il était facilement soluble à l'éther; ce dernier évaporé, le résidu restait sous

On fit dissoudre 60 gr. de l'éther allyle-phthalimidomalonique susmentionné presque parfaitement pur dans 400 cc. d'alcool à 93 %, et l'on versa la solution ainsi obtenue dans une solution chaude de 158 gr. d'hydroxyde de baryum (1 équivalent) dans $\frac{1}{2}$ l. d'eau. Aussitôt ce mélange effectué, il se produisit un précipité blanc, volumineux, dont l'apparence ne changea guère en chauffant (dans une capsule en porcelaine de 2 l.) au bain d'eau bouillante en remuant fréquemment pendant 3 heures, ce qui chassa la majeure partie de l'alcool. A la masse encore chaude et qui avait pris la consistance de bouillie peu claire, on ajouta un mélange de 80 gr. d'acide sulfurique concentré et 400 cc. d'eau, et il se produisit alors un dégagement d'acide carbonique provenant du dédoublement de l'acide malonique substitué mis en liberté. Après une demi-heure de chauffage au bain-marie, on sépara par filtration le sulfate de baryum déposé¹⁾, et l'on évapora le liquide filtré jusqu'au volume de $\frac{1}{4}$ l., puis refroidit, finalement dans de l'eau glacée. Ayant séparé par filtration l'acide phtalique déposé, on a extrait du filtrat, à l'éther²⁾, le reste de cet acide (obtenu, en tout, 27 gr. d'acide phtalique; calculé 28^{gr,7}). La solution débarrassée de l'acide phtalique fut portée au bain-marie afin de chasser l'éther dissous, après quoi une petite quantité d'acide iodhydrique fut précipitée par du sulfate d'argent, et l'acide sulfurique par un déficit aussi petit que possible d'hydroxyde de baryum. La solution ainsi obtenue fut évaporée dans le vide jusqu'à 200 cc. Ensuite on évapora le liquide filtré jusqu'à cristallisation au bain-marie. Après refroidissement et repos jusqu'au lendemain, il s'était déposé un beau précipité blanc, soyeux, lamellé (Glycocolle allylique I: 5^{gr,1}), et dans l'eau mère et celle de lavage on précipita, par le double volume d'alcool, un nouveau précipité d'aspect tout à fait semblable.

forme d'une huile brune, résineuse qui, traitée par l'éther de pétrole, y abandonna encore 3^{gr,5} de composé allylique à peu près pur. Cette substance accusait une teneur en azote de 3,90 % sans être exempt d'iode. On décolora au noir animal la solution alcoolique du reste insoluble à l'éther de pétrole. L'alcool chassé, on versa le double volume d'éther de pétrole dans la solution éthérée: il se précipita alors une huile résineuse qui, dissoute dans l'éther et évaporée à sec, put être réduite en poudre et dont la composition était assez complexe; car elle contenait 3,67 % d'azote et 13,91 % d'iode.

¹⁾ Dans ce sulfate de baryum on pouvait constater une teneur en acide phtalique; en outre il contenait 72 mgr. d'azote.

²⁾ Les extraits étherés étaient très faiblement colorés d'iode dissous, formé sans doute par oxydation d'une quantité insignifiante d'iodure d'hydrogène.

(Glycocolle allylique II: 6^{gr},2.) Enfin, en évaporant l'eau-mère de celui-ci jusqu'à petit volume et précipitant par 4 fois le volume d'alcool, on obtint un troisième produit (Glycocolle allylique III; 4^{gr},4), qui contenait une faible portion d'acide sulfurique, et offrait d'ailleurs le même bel aspect que les deux premiers produits: de même que ceux-ci, il était constitué de beaux feuillet rhomboidaux, souvent à pans coupés, c'est-à-dire ayant la forme de lamelles hexagonales.

Les analyses ci-dessous montrent que les produits obtenus sont constitués de glycocolle allylique presque pure, mêlée, surtout dans le premier produit, à une toute petite portion probablement de glycocolle. Le rendement total: 15^{gr},7, atteint 78,5 % du calcul (60 gr. d'éther allyle-phtalimidomalonique répondent à 20 gr. de glycocolle allylique). Il faut ajouter que l'eau-mère de la glycocolle allylique III renfermait encore de la glycocolle allylique, qu'on en put retirer à l'état de sel cuivrique. Après avoir distillé l'alcool, on chauffa avec du carbonate de cuivre le résidu, dissous dans de l'eau. Le sel cuivrique ne tarda pas à s'isoler, surnageant le liquide sous forme d'une masse volumineuse d'un bleu clair, très difficilement soluble dans l'eau, qui l'humectait à peine. On sépara par filtration le mélange de sel cuivrique et de carbonate de cuivre, puis l'épuisa au bain d'eau bouillante avec 3 + 1 l. d'eau en tout; alors, la majeure partie du sel cuivrique de la glycocolle allylique entra en dissolution, ce qui permit de le récupérer, par évaporation jusqu'à 100 cc., sous forme d'un volumineux dépôt, bleu clair, cristallin (en apparence lamellé) qui, regardé au microscope, n'offrait guère des formes caractéristiques (le rendement: 0,5^{gr} 6).

Nous avons vu que la glycocolle allylique brute, particulièrement celle désignée comme »glycocolle allylique I«, contenait une très petite proportion de glycocolle, dont l'analyse révélait la présence (teneur un peu trop élevée en azote, et trop petite en carbone, v. p. 191). En faisant recristalliser dans de l'alcool de concentrations différentes, on ne parvint pas à séparer la glycocolle allylique d'avec la glycocolle; mais en les transformant en sels cuivriques, on y réussit.

Après avoir dissous dans une abondante quantité d'eau chaude des restes de glycocolle allylique provenant de divers essais de recristallisation, on chauffa la solution au bain-marie en présence d'un excès de carbonate de cuivre. Tandis que la

glycocolle entrainait alors en dissolution à l'état de sel cuivrique — peut-être comme dans le cas de l'oxyacide (v. p. 159) à l'état d'un sel double de glycocolle allylique et de glycocolle — la majeure partie de la glycocolle allylique donna un précipité volumineux et très peu soluble du sel cuivrique comme précédemment mentionné, et mélangé naturellement à l'excès du carbonate cuivrique. Après avoir séparé ce mélange par filtration, on le lava à l'eau chaude et le fit dissoudre dans de l'acide sulfurique étendu. Après précipitation du cuivre par sulfure d'hydrogène, on expulsa par ébullition l'excès de ce dernier et précipita l'acide sulfurique par un déficit aussi petit que possible d'hydroxyde de baryum, et obtint, après avoir évaporé puis précipité par l'alcool la solution obtenue, de la glycocolle allylique parfaitement pure (désignée ci-après comme glycocolle allylique purifiée).

Avant de les analyser, on dessécha dans le vide à 70° tous les échantillons de glycocolle allylique et de sel cuivrique; ils ne perdirent presque rien de leur poids.

$0^{\text{gr}},2135$ de glycocolle allylique I (v. p. 188) ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à $26^{\text{cc}},32$ d'hyposulfite, ce qui répond à $12,33\%$ d'azote.

$0^{\text{gr}},1571$ de glycocolle allylique I ont donné $0^{\text{gr}},2955$ d'acide carbonique ($51,30\%$ de carbone) et $0^{\text{gr}},1122$ d'eau ($7,99\%$ d'hydrogène).

$0^{\text{gr}},1946$ de glycocolle allylique II (v. p. 188) ont donné de l'ammoniaque correspondant à $23^{\text{cc}},88$ d'hyposulfite ($12,27\%$ d'azote).

$0^{\text{gr}},1625$ de glycocolle allylique II ont donné $0^{\text{gr}},3080$ d'acide carbonique ($51,69\%$ de carbone) et $0^{\text{gr}},1200$ d'eau ($8,26\%$ d'hydrogène).

$0^{\text{gr}},1234$ de glycocolle allylique III (v. p. 189) ont donné de l'ammoniaque correspondant à $14^{\text{cc}},83$ d'hyposulfite ($12,02\%$ d'azote).

$0^{\text{gr}},2261$ de glycocolle allylique purifié ont donné de l'ammoniaque correspondant à $27^{\text{cc}},37$ d'hyposulfite ($12,11\%$ d'azote).

$0^{\text{gr}},1672$ de glycocolle allylique purifiée ont donné $0^{\text{gr}},3180$ d'acide carbonique ($51,87\%$ de carbone) et $0^{\text{gr}},1173$ d'eau ($7,85\%$ d'hydrogène).

$0^{\text{gr}},1348$ du sel cuivrique de la glycocolle allylique (v. p. 189) ont donné de l'ammoniaque correspondant à $12^{\text{cc}},92$ d'hyposulfite ($9,58\%$ d'azote).

$0^{\text{gr}},1115$ du même sel cuivrique ont donné $0^{\text{gr}},1670$ d'acide carbonique ($40,85\%$ de carbone) et $0^{\text{gr}},0579$ d'eau ($5,81\%$ d'hydrogène).

$0^{\text{gr}},1298$ du même sel cuivrique ont donné $0^{\text{gr}},0353$ d'oxyde cuivrique ($21,73\%$ de cuivre).

		Calculé	Trouvé			
			I	II	III	purifiée
C ₅	60,00	52,12	51,30	51,69		51,87
H ₉	9,07	7,88	7,99	8,26		7,85
O ₂	32,00	27,80				
N	14,04	12,20	12,33	12,27	12,02	12,11
C ₅ H ₉ O ₂ N		115,11	100,00			

		Calculé	Trouvé
C ₁₀	120,00	41,12	40,85
H ₁₆	16,13	5,53	5,81
O ₄	64,00	21,93	
N ₂	28,08	9,62	9,58
Cu	63,60	21,80	21,73
(C ₅ H ₈ O ₂ N) ₂ Cu		291,81	100,00

Au chauffage, l'échantillon purifié et les échantillons non purifiés de glyocolle allylique, se comportaient identiquement; ils commencèrent à brunir vers 200° et ne fondirent qu'entre 250° et 252° (corr.) avec un vif dégagement gazeux.

La glyocolle allylique est doux au goût et assez facilement soluble dans l'eau, mais presque insoluble dans l'alcool absolu. L'acide phosphotungstique ne précipite pas la solution aqueuse; 0gr,2 de glyocolle allylique se dissolvent à limpidité complète dans 2cc,5 de P-T; abandonnée jusqu'au lendemain, la solution, agitée à diverses reprises, dépose des cristaux prismatiques, quadrilatères et hexagonaux assez facilement solubles tant dans l'eau que dans l'alcool (comparez l'oxyacide p. 168).

Une solution aqueuse de glyocolle allylique décolora instantanément l'eau bromée, probablement en donnant naissance à un mélange de produits d'addition ou de 2 atomes de brome ou de brome et d'oxyhydrile¹⁾; ce n'est qu'en ajoutant un excès d'eau bromée qu'on peut constater un dégagement gazeux. Probablement il ne sera guère difficile, en partant du mélange mentionné ci-dessus, de préparer l'acide α -amino- γ - δ -dioxyvalérique; toutefois, on pourra l'obtenir plus facilement en effectuant la bromuration à un stade moins avancé de la préparation. On peut obtenir l'éther allyle-phtalimidomalonique mentionné plus haut (v. p. 187) à l'état presque pur avec un rendement d'environ

¹⁾ Comparez: E. Biilmann: Journ. prakt. Ch. N. F. 61, 218 (1900).

90 % de la théorie, et additionné de 2 atomes de brome il donnera naissance à un bromure qui, traité par l'acétate potassique, puis décomposé par l'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique, donnera certainement l'acide amino-dioxyvalérique sus-indiqué. Aussitôt que nous en aurons le loisir, nous essayerons de faire cette synthèse dans notre laboratoire, et nous verrons si, à l'instar de la transformation en acide pyrrolidinecarbonique de l'oxyacide mentionné dans le présent mémoire, on ne peut pas convertir l'acide α -amino- γ - δ -dioxyvalérique en l'acide oxy-pyrrolidine- α -carbonique, découvert par E. Fischer parmi les produits de dédoublement de protéines, ou en une combinaison isomère.

En janvier 1905.

LA TENEUR EN AZOTE DE LA LYSINE ET DES COMPOSÉS ANALOGUES PEUT-ELLE ÊTRE DOSÉE PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL?

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET A. C. ANDERSEN.

DANS un mémoire¹⁾ publié il y a un an et demi, S. P. L. Sørensen et C. Pedersen démontrèrent que, contrairement aux assertions de Fr. Kutscher et H. Steudel²⁾, on peut très bien faire par la méthode de Kjeldahl le dosage de l'azote des substances telles que la créatine, la créatinine, l'acide urique et la lysine. Cependant, comme c'est indiqué à la dernière page du mémoire cité, les auteurs avaient reconnu que, — par opposition aux trois premières substances, dont l'analyse suivant la méthode Kjeldahl n'offrait aucune difficulté, — la lysine appartient à cette catégorie de substances qui, par chauffage en présence d'acide sulfurique concentré, abandonnent difficilement tout leur azote à l'état d'ammoniaque. Dans quelques analyses faites plus tard d'un dérivé de la lysine, l'acide lysurique (dibenzoylle-lysine), ces difficultés se sont fait sentir encore plus nettement; car, même par 24 heures d'ébullition, un dosage ordinaire suivant la méthode Kjeldahl ne put donner plus de 7,56 % d'azote dans l'acide lysurique pur, pour lequel la théorie indique 7,93 %. Certes, cet écart est bien moindre que celui trouvé, en appliquant le procédé Kjeldahl, par Kutscher et Steudel³⁾, ainsi qu'antérieurement par Y.-Henderson⁴⁾, en analysant des combinaisons de lysine d'après Kjeldahl; mais, néanmoins, c'est un écart

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 39, 513 (1903); ces mêmes Comptes-rendus 6, 126.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 39, 12 (1903).

³⁾ A l'endroit cité.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 29, 322 (1900).

assez grave. En effet, la lysine constitue un très important produit de décomposition de presque toutes les substances protéiques, et fait probablement partie intégrante de la molécule protéique de façon que l'azote y est lié d'une manière analogue à celle de l'azote

de l'acide lysurique: $\begin{array}{c} | \\ -\text{C}-\text{NH}-\text{CO}- \end{array}$; en conséquence, nous rencontrerons vraisemblablement dans l'analyse des substances protéiques les mêmes difficultés qu'offre celle de l'acide lysurique; seulement l'erreur est moins apparente ici, parce que l'azote de la lysine n'est qu'une petite partie de la totalité de l'azote.

Il est évident que plus la matière à analyser contiendra de lysine, plus grande sera l'erreur, et c'est pourquoi nous avons pensé qu'il y avait grand intérêt à établir

1^o la cause qui fait que, dans le dosage ordinaire de l'azote d'après Kjeldahl, les combinaisons de la lysine abandonnent difficilement la totalité de leur azote à l'état d'ammoniaque; et

2^o la manière dont on pourrait lever ces difficultés.

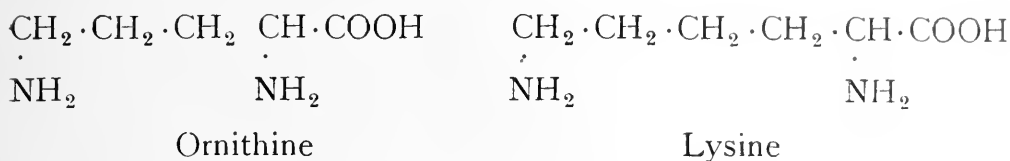
Henderson, ne s'appuyant, il est vrai, que sur un seul essai, admet comme possible qu'en chauffant longtemps de la lysine avec de l'acide sulfurique concentré, il s'échappe une substance azotée volatile. Kutscher et Steudel ont précisé cette idée: S'appuyant sur leurs propres essais et sur ceux de Zickgraf¹⁾ et Herzog²⁾ (tous ces essais avaient démontré que, oxydés par le permanganate de baryum, la lysine, l'histidine, la créatine et la créatinine donnent de l'acide hydrocyanique), ils émettent l'hypothèse que l'ébullition de ces corps en présence d'acide sulfurique concentré pourrait également donner lieu à la production d'acide hydrocyanique. Cette manière d'expliquer la chose a été admise comme possible par Cohnheim dans la dernière édition (1904) de sa célèbre »Chemie der Eiweisskörper«, où il dit en parlant de la lysine: »Nach Henderson, Kutscher und Steudel liefert die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl nicht immer richtige Werte, vielleicht weil ein Teil des Stickstoffs zu Blausäure wird, wie dies bei der Oxydation mit Baryumpermanganat Zickgraf beobachtet hat.«

On verra plus loin que cette explication est mal fondée: même dans une ébullition — si prolongée qu'elle soit —

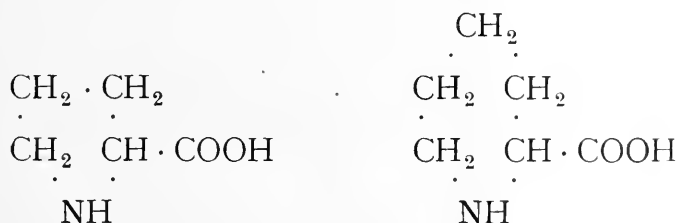
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 3401 (1902).

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 37, 248 (1903).

des combinaisons de lysine en présence d'acide sulfurique concentré il n'y a point de perte d'azote. Il faut donc chercher l'explication ailleurs. En comparant entre elles les formules de l'ornithine et de la lysine, corps dont le premier se comporte d'une façon tout à fait normale dans le dosage ordinaire de l'azote d'après la méthode Kjeldahl:



on verra que les deux formules ne diffèrent l'une de l'autre que par un groupe CH_2 , et l'on ne comprend guère pourquoi, chauffé avec de l'acide sulfurique concentré, l'un des deux composés serait plus disposé que l'autre à dégager de l'acide hydrocyanique ou une autre substance azotée volatile et non alcaline. D'un autre côté, on serait porté à croire que, chauffés en présence d'acides forts, ces composés diaminés abandonneraient de l'ammoniaque avec fermeture de la chaîne, donc avec formation respectivement d'acide pyrrolidine- α -carbonique ou d'acide pipéridine- α -carbonique, et il n'y a rien d'étonnant à ce que de pareilles



Acide pyrrolidine- α -carbonique	Acide pipéridine- α -carbonique
---	--

combinaisons cycliques ne soient pas décomposées avec la même facilité par l'acide sulfurique concentré. Aussi, d'après les faits établis, est-il probable que c'est dans cette voie qu'il faut chercher l'explication; car non seulement l'acide pyrrolidine- α -carbonique, mais aussi toute une série de corps (acides α -amino- δ -oxyvalérique, α - δ -diaminovalérique etc.) susceptibles de former le noyau pyrrolidique, peuvent tous être analysés par la méthode Kjeldahl ordinaire. Par contre, il est très difficile, sinon impossible, de doser par ce procédé l'azote de la pyridine, de la pipéridine ou des composés susceptibles de former un noyau pipéridique (tels

que la lysine, l'acide α - ϵ -diaminopimélique et d'autres)¹⁾. Si l'on veut doser par la méthode Kjeldahl l'azote de ces composés, il est nécessaire de modifier cette méthode de telle façon que l'acide sulfurique puisse agir d'une manière plus énergique. On a tout d'abord la ressource d'élever le point d'ébullition de l'acide sulfurique (et par conséquent la température à laquelle la décomposition a lieu) en ajoutant du sulfate de potassium, ainsi que l'a proposé le premier Gunning²⁾. Aussi a-t-on pu constater que les composés sus-mentionnés même les plus difficilement décomposables peuvent s'analyser au moyen de la méthode Kjeldahl modifiée par Gunning; seulement il a fallu une ébullition très prolongée pour convertir intégralement l'azote en ammoniac. La décomposition s'opéra le plus facilement et le plus rapidement par la combinaison, primitivement proposée par Arnold et Wedemeyer³⁾, des modifications apportées par Gunning et par Arnold, combinaison qui, on le sait, consiste à ajouter non seulement du sulfate potassique, mais encore les agents catalytiques oxyde de mercure et oxyde de cuivre⁴⁾.

Aussi a-t-on pu établir que dans le dosage ordinaire d'après Kjeldahl il n'y a pas perte d'azote; car, après l'ébullition ordinaire en présence d'acide sulfurique et un petit peu d'oxyde cuivrique, on put, en ajoutant du sulfate potassique, de l'oxyde mercurique et de l'oxyde cuivrique, puis portant de nouveau à l'ébullition, achever la décomposition et obtenir la presque totalité de l'azote à l'état d'ammoniac.

¹⁾ Il y a lieu de rappeler ici que K. Andrlík (Zeitschr. f. Zuckerindustrie in Böhmen 26, 667 (1902)) a signalé que certains produits azotés tirés des résidus de la fabrication du sucre, ainsi que des substances telles que la bétanine et la cofféine, fournissent par ébullition avec de l'acide sulfurique concentré, en plus de l'ammoniac, des corps qui résistent opiniâtrément à l'action de l'acide sulfurique. Andrlík est d'avis qu'il s'agit ici d'amines difficilement décomposables. Kutscher et Steudel, se rangeant à cet avis, émettent dans leur travail l'hypothèse que les difficultés de la méthode Kjeldahl signalées par eux peuvent s'expliquer de la même manière.

²⁾ Zeitschr. anal. Ch. 28, 188 (1889).

³⁾ Ibid. 31, 525 (1892).

⁴⁾ Comparez le beau travail de G. Bredig et J. W. Brown: »Katalytische Oxydationen organischer Substanzen mit konzentrierter Schwefelsäure« (Zeitschr. physik. Ch. 46, 502 (1903)). Les auteurs signalent, entre autres choses, que le sulfate de potassium n'a pas d'action catalytique, mais ne fait qu'élever la température. Il est démontré aussi dans cet ouvrage que l'action catalytique d'un mélange des sulfates mercurique et cuivrique est supérieure à la somme des actions de ces deux sels métalliques employés séparément.

Il appert donc que par un traitement par l'acide sulfurique concentré, l'azote de ces composés se comporte tout à fait comme l'on devait s'y attendre d'après la constitution desdits composés: à cet égard il n'y a pas de différence essentielle, mais seulement une différence graduelle entre ces corps et toutes les autres combinaisons aminées aliphatiques: quelques-uns sont plus facilement décomposables que les autres; ceux mentionnés ici sont au nombre des composés les plus difficilement décomposables; mais il n'est pas question d'une perte d'azote au cours du chauffage.

Ainsi on n'a pas rencontré jusqu'ici, parmi les produits de décomposition des protéines, aucune combinaison dont l'azote soit lié de telle manière qu'il ne puisse pas intégralement se convertir en ammoniaque par un chauffage convenable en présence d'acide sulfurique concentré. D'un autre côté, il ressort de ce que nous venons de dire que parmi lesdits produits de décomposition il peut se trouver des substances difficilement et parfois incomplètement décomposables par le procédé ordinaire de Kjeldahl. Par suite, dans l'analyse des matières protéiques ou de leurs produits de décomposition, il est toujours recommandable d'examiner si le dosage de l'azote d'après la méthode ordinaire de Kjeldahl, d'un côté, et, de l'autre, d'après la modification combinée de Gunning et Arnold¹⁾, donnent des résultats identiques: C'est seulement dans ce cas qu'on peut se servir de la méthode plus simple de Kjeldahl.

Arnold et Wedemeyer ont fait des recherches pour savoir comment un certain nombre de corps renfermant des anneaux azotés hétérogènes se comportent dans les dosages d'azote d'après les diverses modifications de la méthode Kjeldahl. Ces auteurs arrivent à cette conclusion²⁾ qu'un corps qui, dans un dosage ordinaire d'après Kjeldahl, donne moins d'ammoniaque qu'il ne le fait par la méthode modifiée de Gunning-Arnold, renferme des noyaux azotés. Conformément à cela, on a toujours regardé ce fait que les matières protéiques et leurs produits de décomposition peuvent être analysés suivant le procédé ordinaire de Kjeldahl, comme une preuve de l'absence des anneaux azotés dans la molécule de ces corps.

¹⁾ Même ici il est indispensable de faire bouillir pendant 3 heures au moins (voir les essais nos 50 à 59).

²⁾ A l'endroit cité, p. 530.

Les résultats communiqués dans le présent mémoire ne changent pas cette manière de voir, mais tendent pourtant à montrer que, du moins pour ce qui concerne les substances protéiques et leurs produits de décomposition, il faut donner à la thèse formulée par Arnold et Wedemeyer la forme un peu plus étendue que voici: »Si, dans un dosage ordinaire d'après Kjeldahl, une matière protéique, ou un de ses produits de décomposition, donne moins d'ammoniaque qu'elle ne le fait dans un dosage d'après la modification de Gunning-Arnold, elle renferme ou bien des substances difficilement décomposables à noyau azoté (telles que des dérivés de la pyridine ou de la pipéridine) ou bien des substances susceptibles d'en former par condensation interne.

Les dosages d'azote réunis ci-dessous en forme de tableaux, ont été effectués de différentes manières:

1^o Dosages d'après la méthode habituelle de Kjeldahl¹⁾ (désignés par »K«).

2^o Dosages d'après la modification de Gunning (désignés par »G«); on employa pour chaque essai 20 gr. de sulfate de potassium + 20 cc. d'acide sulfurique concentré.

3^o Dosages d'après la modification de Gunning-Arnold (désignés par »G-A«). On chauffa la substance pendant $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ heure avec un mélange de 1 gr. d'oxyde de mercure, 0^{gr},5 d'oxyde de cuivre, 5 gr. de sulfate de potassium et 20 cc. d'acide sulfurique concentré, ce qui fit virer au vert la couleur de la solution. Ensuite, après addition d'encore 15 gr. de sulfate potassique, on continua le chauffage. Dans ces dosages, ainsi que dans ceux indiqués sous la rubrique suivante (4^o), on s'est servi, pour la distillation de l'ammoniaque, d'un mélange de solutions d'hydroxyde et de sulfhydrate de sodium.

4^o Dans ces dosages on a soumis la substance à une ébullition prolongée, d'abord avec 20 cc. d'acide sulfurique concentré et un peu d'oxyde de cuivre, de même que dans un dosage ordinaire d'après Kjeldahl; ensuite on a ajouté 1 gr. d'oxyde

¹⁾ Description détaillée dans ces mêmes Comptes-rendus 6, 130.

de mercure, 0^{gr},5 d'oxyde de cuivre et 20 gr. de sulfate de potassium, puis repris l'ébullition comme dans un dosage suivant Gunning-Arnold. (Désignés par »K.—G.-A.«).

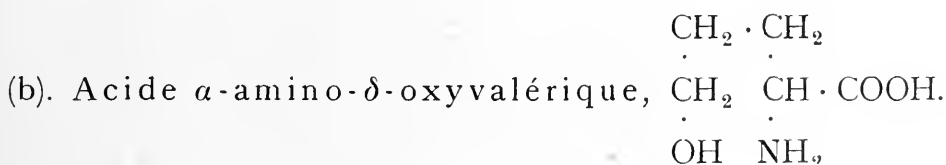
La durée de l'ébullition est indiquée pour chaque essai. Quant à l'oxydation au moyen du permanganate de potassium, on n'y a eu recours que dans les dosages ordinaires suivant Kjeldahl.

A. Composés renfermant ou susceptibles de former des anneaux à cinq chaînons constitués de quatre atomes de carbone et un atome d'azote.

Toutes les combinaisons appartenant à cette catégorie, ont pu être analysées d'après la méthode Kjeldahl ordinaire.



Quelques analyses, tant de l'acide libre (trouvé 10,38 % d'azote; calculé 10,55 %) que de son sel cuivrique, qui cristallise avec 2 molécules d'eau de cristallisation par atome de cuivre (trouvé 8,51—8,56 % d'azote; calculé 8,57 %), se trouvent dans le précédent mémoire, p. 156, 157, 175 et 181.



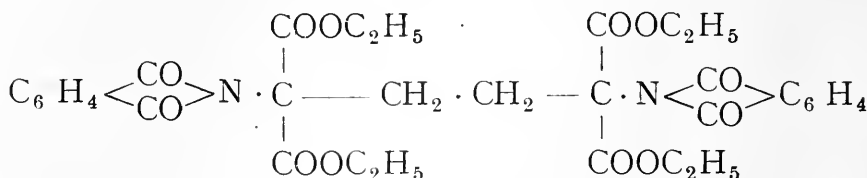
Un certain nombre d'analyses, tant de l'acide libre (trouvé 10,48—10,57 % d'azote; calculé 10,55 %) que de son sel cuivrique (trouvé 8,53—8,58 % d'azote; calculé 8,57 %), se trouvent dans le précédent mémoire, p. 161 et 163.



Des analyses d'un certain nombre de dérivés de cet acide (tels que l'acide α - δ -dibenzoyl-diaminovalérique, l'acide ornithu-

rique: trouvé 8,14—8,20 % d'azote; calculé 8,24 % se trouvent dans ces mêmes Comptes-rendus 6, p. 32—57 (1902).

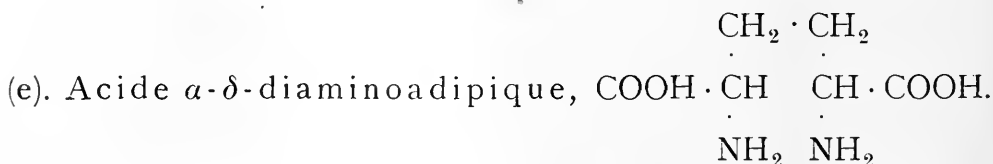
(d). Éther éthylène-diphthalimidomalonique,



On prépara ce composé par un traitement convenable de l'éther phthalimido-sodomalonique avec du bromure d'éthylène¹⁾.

Dosages d'azote. (Calculé: 4,41 % d'azote).

N° des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammoniaque correspondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition
	gr.	cc.	%	
1	0,4195	18,26	4,35	K. Vert pur après 7 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 7 heures.
2	0,4055	17,66	4,36	K. Comme n° 1. Seulement durée de l'ébullition 9 heures.
3	0,4554	19,91	4,37	K. Comme n° 1. Durée de l'ébullition 11 heures.
4	0,4361	19,06	4,37	K. Comme n° 1. Durée de l'ébullition 20 heures.
5	0,4365	19,06	4,37	G.-A. Vert pur au cours d'une demi-heure, puis bouilli pendant 2 heures.



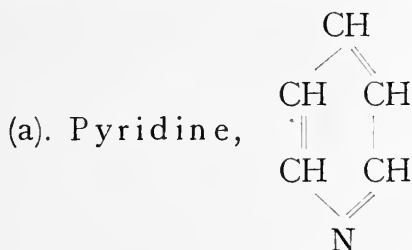
On prépara cet acide en partant de l'éther éthylène-diphthalimidomalonique sus-mentionné, par saponification au moyen d'hydroxyde de baryum, suivie d'une évaporation en présence d'acide chlorhydrique¹⁾.

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 147 (1905). (Communication préliminaire).

Dosages d'azote (calculé 15,94 % d'azote).

N ^o des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
6	0,0994	15,65	15,74	K. Vert pur après 1 heure d'ébullition; durée totale de l'ébullition 3 heures.
7	0,1293	20,40	15,78	K. Comme n ^o 6; pourtant chauffé pendant 10 heures.
8	0,1192	18,80	15,77	K. Comme n ^o 6; pourtant chauffé pendant 22 heures.
9	0,1753	27,72	15,81	G.-A. Bonilli pendant 3 heures en tout.

B. Combinaisons renfermant ou susceptibles de former des anneaux à six chaînons constitués de cinq atomes de carbone et un atome d'azote.



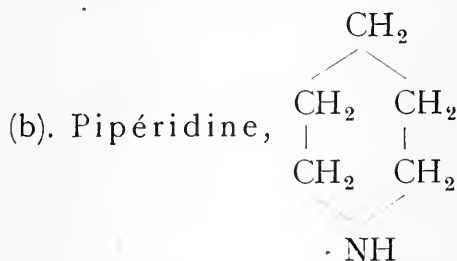
La pyridine employée dans ces analyses n'était pas tout à fait pure; car, dosée suivant la méthode Dumas, — méthode qui, comme d'habitude, a donné probablement des résultats un peu trop élevés¹⁾, — elle ne contenait que 17,63 % d'azote (calculé 17,75 %). Conformément, la modification Gunning-Arnold a donné 17,36 %, soit un peu moins de la teneur réelle en azote, qui était probablement de 17,5 % environ.

On mit 20 cc. d'acide sulfurique double-normal dans une fiole jaugée de 100 cc., puis pesa celle-ci, en employant comme contre-poids une fiole tout à fait analogue. Après addition d'environ 1^{cc},5 de pyridine, on pesa de nouveau; poids de la pyridine: 1^{gr},4027. Après abandon jusqu'au lendemain, on remplit la fiole, jusqu'au trait, d'eau distillée. On a employé pour chaque analyse 10 cc. de cette solution, correspondant à 0^{gr},1403 de pyridine. Après addition de 1 cc. d'acide sulfurique concentré, on évapora l'eau dans l'étuve à 120°, puis effectua les dosages de la manière habituelle; le chauffage en présence d'acide sulfurique concentré n'a pas produit de carbonisation.

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 136.

Dosages d'azote.

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	‰	
10	0,1403	22,95	16,36	K. Durée totale de l'ébullition 2 ¹ / ₄ heures.
11	0,1403	22,75	16,22	K. — — — — 4 ¹ / ₄ —
12	0,1403	23,05	16,43	K. — — — — 6 ¹ / ₄ —
13	0,1403	22,95	16,36	K. — — — — 22 —
14	0,1403	24,35	17,36	G.A. — — — — 2 ¹ / ₄ —



On prépara d'une manière analogue à celle employée dans le cas de la pyridine, deux solutions de pipéridine dans de l'acide sulfurique dilué; la première contenant 0^{gr},1721 de pipéridine par 10 cc., fut employée pour les essais n^{os} 15 à 21, la seconde, contenant 0^{gr},1518 de pipéridine par 10 cc., pour les n^{os} 22 à 27. Dans les essais n^{os} 15, 16 et 17 on a employé 10 cc. d'acide sulfurique concentré, dans tous les autres 20 cc. Même dans ce cas on n'a pu constater aucune carbonisation par l'ébullition en présence d'acide sulfurique concentré.

L'un de nous, en collaboration avec C. Pedersen, a déjà signalé dans le mémoire précité¹⁾ qu'une oxydation par le permanganate de potassium peut être nécessaire dans un dosage ordinaire par le procédé Kjeldahl, même si la couleur du liquide est d'un vert pur; car, malgré cela, la décomposition n'a pas été consommée. Les essais n^{os} 15 à 19 en fournissent un bon exemple. Durant l'ébullition, la solution a toujours conservé sa couleur vert pur, et néanmoins, même après 36 heures d'ébullition comme dans les essais n^{os} 18 et 19, la décomposition est loin d'être achevée. En effet, l'oxydation par le permanganate de potassium en a demandé abondamment, tant dans l'essai n^o 18 que dans les essais n^{os} 15 à 17, avant que la totalité de la matière organique fût oxydée et que la formation du dépôt vert foncé sale²⁾ commençât. Ainsi que le montre le tableau (ess. n^{os} 15 à 18), on a réussi dans les dosages ordinaires d'après Kjel-

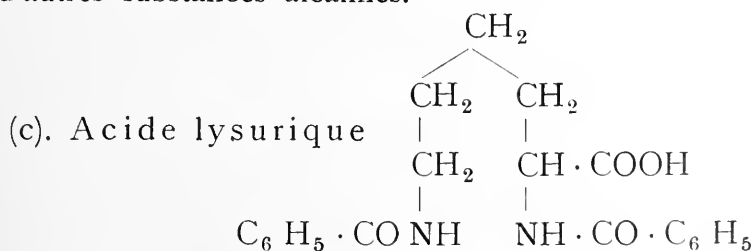
¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 129.

²⁾ A l'endroit cité, p. 131.

Dosages d'azote (calculé 16,49 % d'azote).

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
15	0,1721	24,60	14,29	K. Durée totale de l'ébullition 3½ heures.
16	0,1721	24,90	14,47	K. — — — — 10 —
17	0,1721	25,30	14,70	K. — — — — 24 —
18	0,1721	25,40	14,76	K. — — — — 36 —
19	0,1721	18,60	10,81	K. — — — — 36 —; pas d'oxydation par le permanganate po- tassique.
20	0,1721	28,15	16,36	G.-A. Durée totale de l'ébullition 2½ heures.
21	0,1721	28,15	16,36	G.-A. — — — — 2½ —
22	0,1518	22,95	15,12	K. — — — — 12 —
23	0,1518	24,60	16,21	G. — — — — 12 —
24	0,1518	24,80	16,34	G. — — — — 18 —
25	0,1518	24,90	16,40	G.-A. — — — — 2½ —
26	0,1518	24,90	16,40	K.-G.-A. Chauffé d'après Kjeldahl pendant 16 heures, puis suivant G.-A. pendant 2 heures.
27	0,1518	24,80	16,34	K.-G.-A. Comme dans n ^o 26.

dahl, par oxydation au moyen de permanganate de potassium, à convertir en ammoniaque la plus grande partie de l'azote. Par contre, dans l'essai n^o 19, où il n'y a pas eu oxydation par le permanganate, c'est à peine si les deux tiers de l'azote ont été convertis en ammoniaque. Du reste, au cours du titrage iodométrique effectué dans ce dernier essai, un *bleuissement subséquent* extraordinairement intense a fait voir que le distillat renfermait, en plus de l'ammoniaque, encore d'autres substances alcalines.



On a préparé l'acide lysurique en partant de la lysine racémique obtenue par voie de synthèse¹⁾, et à laquelle on a fait subir une benzylation en milieu légèrement alcalin, puis une précipitation par l'acide chlorhydrique. On épuisa l'acide brut à l'éther de pétrole bouillant, ce qui le débarrassa de son acide benzoïque libre; puis on le soumit à une nouvelle cristallisation dans l'acétone. Un dosage par le procédé Dumas donna une teneur en azote de 7,98%.

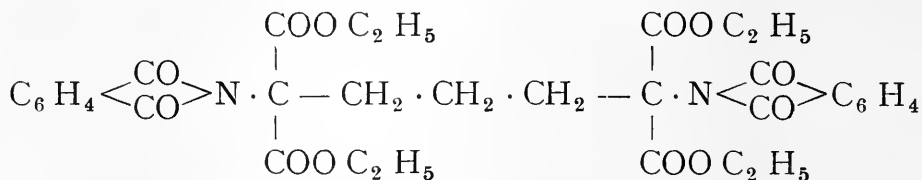
¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 60 (1902).

Dosages d'azote (calculé 7,93 %).

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
28	0,1942	13,97	7,19	K. Vert pur après 5 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 5 heures.
29	0,2443	18,21	7,45	K. Vert pur après 6 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 8 heures.
30	0,2338	17,42	7,45	K. Comme n ^o 29; pourtant chauffé pendant 10 heures.
31	0,2160	16,32	7,56	K. Comme n ^o 29; pourtant chauffé pendant 24 heures.
32	0,2713	19,80	7,30	K. Vert pur après 7 heures d'ébullition. Durée totale d'ébullition 36 heures.
33	0,3178	24,85	7,82	G.-A. Durée d'ébullition 2½ heures.
34	0,1844	14,45	7,84	G.-A. Comme n ^o 33.
35	0,2273	17,85	7,85	K.-G.-A. Chauffé d'après Kjeldahl pendant 34 heures, puis suivant G.-A. pendant 2 heures.

Dans les essais n^{os} 28 à 31 on a mis en œuvre 10 cc., dans les autres 20 cc. d'acide sulfurique concentré.

(d). Éther triméthylène-diphthalimidomalonique,



On a préparé ce composé en traitant d'une manière convenable de l'éther phthalimido-sodomalonique par le bromure de triméthylène¹⁾. Un dosage d'après Dumas donna 4,43 % d'azote.

Dosages d'azote (calculé 4,32 %).

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
36	0,3982	16,22	4,07	K. Vert pur après 7 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 7 heures.
37	0,4045	16,42	4,06	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 9 heures.
38	0,3456	13,88	4,02	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 10 heures.
39	0,4336	17,56	4,05	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 12½ heures.
40	0,4156	16,62	4,00	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 24 heures.
41	0,4807	20,41	4,25	G.-A. Durée de l'ébullition 2½ heures.

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 147 (Communication préliminaire).



On prépara cet acide en partant de l'éther triméthylène-di-phtalimidomalonique nommé ci-dessus, par saponification au moyen d'hydroxyde de baryum, puis évaporation par l'acide chlorhydrique¹⁾. Pour quelques-uns des essais réunis ci-dessous en forme de tableau, on a employé des quantités pesées d'avance de l'acide, pour d'autres une solution, préparée comme dans le cas de la pyridine, de l'acide dans de l'acide sulfurique étendu, solution

Dosages d'azote (calculé 14,76 %).

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
42	0,1511	20,80	13,77	K. Durée de l'ébullition 3 heures.
43	0,1473	19,85	13,48	K. — . — 6 —
44	0,1473	20,15	13,68	K. — . — 12 —
45	0,1471	20,00	13,60	K. — . — 18 —
46	0,1473	21,50	14,60	G. — . — 6 —
47	0,1473	21,45	14,56	G. — . — 12 —
48	0,1338	19,45	14,54	G. — . — 18 —
49	0,1473	21,55	14,63	G. — . — 24 —
50	0,1404	20,45	14,57	G.-A. — . — 2 ¹ / ₂ —
51	0,1473	21,45	14,56	G.-A. — . — 2 ¹ / ₂ —
52	0,1247	18,20	14,59	G.-A. — . — 3 —
53	0,1473	21,60	14,66	G.-A. — . — 4 —
54	0,1473	21,45	14,56	G.-A. — . — 8 —
55	0,1382	19,55	14,15	K.-G.-A. Chauffé d'après K. pendant 16 heures, puis d'après G.-A. pendant 2 heures.
56	0,1319	19,30	14,63	K.-G.-A. Chauffé d'après K. pendant 16 heures, puis d'après G.-A. pendant 4 heures.
57	0,1473	20,75	14,09	K.-G.-A. Chauffé d'après K. pendant 18 heures, puis d'après G.-A. pendant 2 heures.
58	0,1473	21,55	14,63	K.-G.-A. Chauffé d'après K. pendant 18 heures, puis d'après G.-A. pendant 4 heures.
59	0,1473	21,45	14,56	K.-G.-A. Chauffé d'après K. pendant 18 heures, puis d'après G.-A. pendant 8 heures.

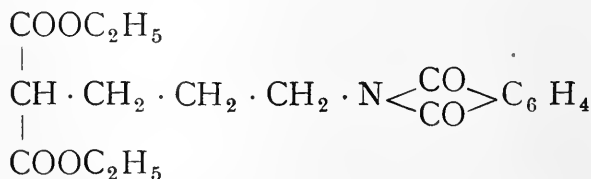
¹⁾ A l'endroit cité.

qui contenait 0^{gr},1473 de l'acide par 10 cc. Un chauffage en présence d'acide sulfurique n'a pas donné de carbonisation. Tous les dosages d'après le procédé ordinaire de Kjeldahl (nos 42 à 45) furent effectués avec 10 cc. d'acide sulfurique concentré, et pour parfaire l'oxydation subséquente par le permanganate potassique on a dû en employer des quantités notables avant l'apparition du dépôt vert foncé sale. Tous les autres dosages furent effectués avec 20 cc. d'acide sulfurique concentré.

Il ressort de ces tableaux que les trois derniers corps (acide lysurique, éther triméthylène-diphtalimidomalonique et acide α - ε -diaminopimélique), susceptibles de former, par ébullition en présence d'acide sulfurique concentré, un noyau pipéridique, avec élimination d'ammoniaque, se comportent comme la pipéridine elle-même: par la méthode ordinaire de Kjeldahl pour le dosage de l'azote, ils donnent des résultats plus bas que par les modifications Gunning ou Gunning-Arnold.

Si l'on substitue un groupe CO à un groupe CH₂ de l'anneau pipéridique, cet anneau devient plus facilement décomposable; c'est ainsi que la pipéridone peut être analysée par la méthode ordinaire de Kjeldahl, et il en est de même pour l'acide γ -aminopropyle-malonique, qui par simple distillation abandonne l'acide carbonique et l'eau, avec formation de pipéridone. Il nous semble d'autant plus étonnant que, même en soumettant à une ébullition très prolongée suivant le procédé Kjeldahl la matière première destinée à la préparation dudit acide aminé, c'est-à-dire l'éther γ -phtalimidopropyle-malonique préparé primitivement par S. Gabriel¹⁾, elle donne des résultats un peu trop bas.

(f). Éther γ -phtalimidopropyle-malonique,

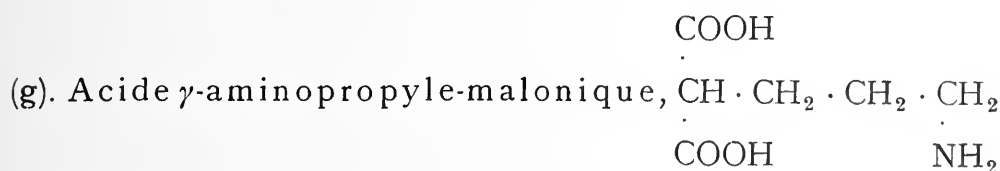


Cet éther a été préparé par le procédé de Gabriel.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 23, 1767 (1890), et 24, 1364 (1891).

Dosages d'azote (calculé 4,04 %).

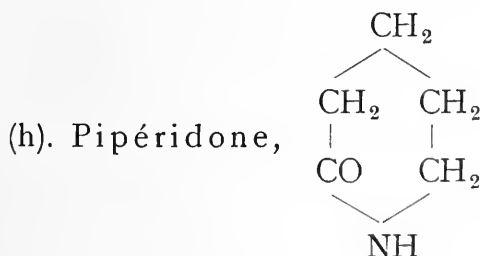
N ^o des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
60	0,3711	13,14	3,54	K. Durée de l'ébullition 5 heures.
61	0,2329	8,75	3,76	K. — — — 16 —
62	0,2770	10,85	3,92	K. — — — 24 —
63	0,7451	30,49	4,09	G.-A. — — — 2 —



On a préparé cet acide en partant de l'éther sus-mentionné, en décomposant avec de l'hydroxyde de baryum et traitant par l'acide chlorhydrique d'une manière convenable.

Dosages d'azote (calculé 8,71 %).

N ^o des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
64	0,1694	14,60	8,62	K. Durée de l'ébullition 3 heures.
65	0,1473	12,80	8,69	K. — — — 6 —
66	0,1488	12,90	8,67	K. — — — 10 —
67	0,2057	17,90	8,70	K. — — — 21 —
68	0,1714	14,95	8,72	G.-A. — — — 2 $\frac{1}{2}$ —



On prépara ce composé en chauffant l'acide γ -aminopropyle-malonique mentionné plus haut dans un ballon à fractionner plongé dans le bain d'huile, opération qui fit se dégager de

l'acide carbonique et de l'eau. A 250° à 257° , il passa une huile jaunâtre qui, refroidie à l'eau glacée, se prit en une masse cristalline; elle était très probablement constituée de pipéridone, avec une faible teneur en eau; aussi était-elle demi-liquide à la température ambiante. Conformément, tant par le procédé ordinaire de Kjeldahl que par la modification de Gunning-Arnold, on a trouvé une teneur en azote un peu inférieure au calcul ($14,17\%$).

Dosages d'azote.

N ^o des essais	Poids de substance	Proportion de l'ammo- niacque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
69	0,1611	22,00	13,66	K. Durée de l'ébullition 6 heures.
70	0,1611	22,10	13,72	K. — — — 10 —
71	0,1611	22,20	13,78	K. — — — 17 —
72	0,1611	22,20	13,78	G.-A. — — — $2\frac{1}{2}$ —

Pour terminer, il faut mentionner que l'acide α -aminoadipique, $\text{COOH} \cdot \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2$, susceptible de former l'acide pi-

NH_2
 COOH

péridone-carbonique par mise en liberté d'eau, peut se doser par la méthode Kjeldahl¹⁾.

¹⁾ V. ces mêmes Comptes-rendus 6, p. 24—p. 31 (1902).

En février 1905.

ÉTUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS

PAR

S. P. L. SØRENSEN.

VI. Dédoublément de l'acide ornithurique racémique en formes optiquement actives.

Dans un mémoire publié il y a deux ans¹⁾ je signalais certaines divergences entre l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique obtenu par voie de synthèse, d'un côté, et, de l'autre, l'acide ornithurique tiré de produits naturels. Sans doute, ces divergences étaient toutes de nature à faire présumer que les deux acides indiqués étaient l'un à l'autre ce qu'une combinaison racémique est à la modification optiquement active correspondante; mais l'exactitude de cette conjecture n'avait pas encore été vérifiée. C'est ce qui fait l'objet du présent mémoire.

Si l'on traite de l'acide ornithurique racémique (c'est-à-dire de l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique préparé par voie de synthèse) par une quantité équivalente d'un alcaloïde (je me suis servi à cet effet de cinchonine, morphine, strychnine et brucine) et par une quantité convenable d'eau chaude, on parvient aisément à former des solutions d'ornithurates racémiques des alcaloïdes, solutions qui, évaporées et réfrigérées convenablement, font tomber des dépôts huileux constitués de l'un des ornithurates optiquement actifs d'alcaloïdes, à l'état plus ou moins pur.

Ce n'est qu'en employant l'alcaloïde brucine que j'ai réussi à obtenir sous la forme cristalline le dépôt constitué en ce cas de l'ornithurate droit de brucine; dans tous les autres cas

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 58 (1902).

je n'ai obtenu que des huiles aptes à former, en se desséchant, des masses résineuses, plus ou moins friables. C'est ainsi que, en partant directement de l'acide ornithurique racémique, il n'a pas été possible de préparer à l'état pur et cristallin le sel d'alcaloïde de la modification gauche; au contraire, en prenant comme point de départ l'acide ornithurique gauche passablement pur retiré de l'eau-mère de l'ornithurate droit de brucine, j'ai réussi sans trop de difficulté à préparer l'ornithurate gauche de cinchonine pur et à l'état cristallin.

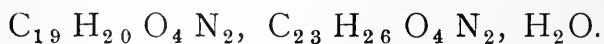
En partant des sels d'alcaloïdes, je pus éliminer l'alcaloïde à l'aide d'hydroxyde de sodium, et en précipitant par l'acide chlorhydrique la solution ainsi obtenue j'obtins alors l'acide ornithurique. L'acide ornithurique droit ainsi préparé se comportait tout à fait (conférez pourtant le pouvoir rotatoire spécifique, p. 221) de la même manière que celui tiré de produits naturels et, à l'exception du signe du pouvoir rotatoire, l'acide gauche offrait exactement les mêmes propriétés. On trouvera vers la fin de ce mémoire un exposé sommaire de cet état de choses.

Il s'ensuit donc qu'on est parvenu

1^o à réaliser la synthèse complète tant de l'acide ornithurique droit que de l'acide gauche, — et

2^o à établir l'identité de l'acide α - δ -dibenzoyl-diaminovalérique droit avec l'acide ornithurique naturel.

1. Ornithurate droit de brucine.



On traita $\frac{1}{10}$ molécule-gramme (34 gr.) d'acide ornithurique racémique et $\frac{1}{10}$ molécule-gramme (46^{gr},6) de brucine renfermant de l'eau de cristallisation dans un ballon de la capacité de 5 l. et contenant 3 l. d'eau. On chauffa au bain-marie pendant 2 heures, en agitant bien. Presque le tout était alors entré en dissolution; toutefois il se trouvait au fond du matras une petite quantité d'une masse résineuse qui, chauffée ultérieurement, finit par se cristalliser. Un chauffage ultérieur de 4 heures fit augmenter d'une manière appréciable la proportion de la masse cristalline, et même sur les côtés du ballon on observa un commencement de cristallisation. On transvasa alors le tout dans une capsule en porcelaine d'assez grande capacité et rinça le ballon deux ou trois fois à l'eau chaude. On laissa reposer jus-

qu'au lendemain, en ayant soin d'agiter fréquemment; il s'était alors formé un joli dépôt cristallin qui, au microscope, offrait l'apparence d'agglomérations de cristaux lamellés assez épais. On essora à la trompe et lava 3 fois à l'eau froide le dépôt, qui était faiblement coloré ainsi que l'eau-mère. Après dessiccation à l'air, le poids était de 28^{gr},5.

Évaporées au bain-marie jusqu'à un volume de 1¹/₄ à 1¹/₂ l., puis abandonnées à elles-mêmes, les eaux mère et de lavage fournirent un nouveau dépôt qui, cependant, était en partie huileux. Quant au produit principal, on le purifia par recristallisation. Par traitement dans une capsule, placée au bain-marie avec 3 + 1 + 1¹/₂ + 1¹/₂ l. d'eau préalablement portée à l'ébullition, le tout entra en dissolution, sauf quelques flocons bruns, qu'on sépara par filtration à chaud. Ayant laissé le liquide filtré dans des capsules de porcelaine jusqu'au lendemain, on obtint de nouveau un joli dépôt cristallin et presque incolore; le microscope révéla de beaux prismes incolores à six pans, le plus souvent surmontés de pyramides, souvent aussi aplatis et présentant la forme de feuillets longs et assez épais, irréguliers, hexagonaux. Le dépôt qui, après essorage, lavage et dessiccation à l'air, accusait un poids de 19 gr., fut recristallisé encore une fois de la même manière; on en récupéra 13^{gr},3.

Les autres détails sont consignés dans le schéma des fractionnements (v. p. 213), qui montre nettement les procédés par lesquels on a obtenu les différentes fractions.

On a éliminé la brucine de chaque fraction en chauffant avec de l'eau et avec une proportion d'hydroxyde de sodium dépassant un peu celle requise pour faire précipiter la brucine; ensuite, on a réfrigéré à l'eau glacée, essoré à la trompe et lavé à l'eau froide la brucine déposée. On fit refroidir à la glace la liqueur alcaline filtrée, et l'on fit précipiter l'acide ornithurique au moyen d'acide chlorhydrique; après un abandon jusqu'au lendemain, on filtra et débarrassa l'acide ornithurique de l'acide chlorhydrique par des lavages à l'eau froide, puis plusieurs fois à l'eau chaude. Dans l'eau-mère de l'acide ornithurique on put toujours, au moyen des réactifs généraux des alcaloïdes, constater la présence d'une petite quantité de brucine. Afin de l'en débarrasser, et pour plus de sûreté, on fit chaque fois redissoudre l'acide ornithurique dans une lessive de soude, et on le précipita, puis lui fit subir le même traitement que la première fois. Dans

cette seconde eau-mère, on ne put ordinairement reconnaître qu'une trace de brucine.

Le poids des portions d'acide ornithurique retirées des diverses fractions et séchées à l'air, se trouve indiqué dans le schéma. Desséchées dans le vide à 80°, toutes les préparations séchées à l'air perdirent un peu de leur poids (0,1 à 0,4 %).

On détermina, en lumière du sodium (à 20°), par le procédé habituel, le pouvoir rotatoire dans une solution légèrement alcaline des préparations ainsi séchées; dans l'avant-dernière ligne du schéma on trouvera les valeurs établies de $[\alpha]_D^{20}$. La rotation spécifique de l'acide ornithurique dépend essentiellement de la concentration; c'est pourquoi, comme on le verra plus loin (p. 220), j'ai déterminé la déviation que donne l'acide ornithurique droit dans des solutions faiblement alcalines à 20, 10 et 5 %, et en partant des valeurs ainsi trouvées de $[\alpha]_D^{20}$, j'ai pu déterminer graphiquement et avec une exactitude suffisante la valeur qu'il faut y attribuer pour toutes les concentrations intermédiaires. La dernière ligne du schéma indique sous la désignation » $[\alpha]_D^{20}$ calculé« la valeur de $[\alpha]_D^{20}$ qui, conformément à ce que je viens de dire, correspond à la concentration employée et à laquelle on serait arrivé, si l'acide ornithurique en jeu avait été un composé pur respectivement droit ou gauche.

1^{gr},5022 de fraction A dissous dans 2^{cc},5 de lessive de soude 2. normale rempli de l'eau jusqu'à un volume total de 20 cc., m'a donné une déviation en lumière du sodium dans un tube de 2 décimètres à 20° de + 1° 26'; donc $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},54$; calculé + 9° 59.

1^{gr},1958 de fraction B (dissous dans 2 cc. de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 1° 10'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},76$; calculé + 9° 80.

0^{gr},8784 de fraction C (dissous dans 1^{cc},5 de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 53'; $[\alpha]_D^{20} = + 10^{\circ},05$; calculé + 10° 04.

2^{gr},2088 de fraction D (dissous dans 3^{cc},7 de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 2° 3'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},28$; calculé + 9° 17.

0^{gr},7134 de fraction E (dissous dans 1^{cc},2 de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 40'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},35$; calculé + 10° 15.

1^{gr},3201 de fraction F (dissous dans 2^{cc},2 de lessive de soude + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 1° 14'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},34$; calculé + 9° 70.

1^{gr},8043 de fraction G (dissous dans 3 cc. de lessive de soude + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de ÷ 1° 3'; $[\alpha]_D^{20} = \div 5^{\circ},82$; calculé ÷ 9° 40.

1^{gr},8588 de fraction H (dissous dans 3 cc. de lessive de soude + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^0 34'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 8^0,43$; calculé $\div 9^0,36$.

Il ressort du schéma que même le dépôt formé en premier lieu (28^{gr},5) était constitué par un composé droit presque parfaitement pur; car ce n'est que dans la fraction E, soit la dernière de celles qui proviennent de ce dépôt, qu'on retrouve un peu du composé racémique. Par conséquent, comme on devait s'y attendre, le dépôt recristallisé (19 gr.) est parfaitement pur; car tous les produits obtenus par une nouvelle recristallisation de ce dépôt (les fractions A, B et C) possèdent le même pouvoir rotatoire spécifique. Sans doute les fractions G et H ne contiennent pas de composé gauche pur; mais on reconnut que l'acide ornithurique qu'elles fournissaient était un excellent point de départ pour la préparation de l'ornithurate gauche de cinchonine (voir plus bas).

Le total de l'acide ornithurique racémique traité comme précédemment décrit, se montait à 80 gr. A partir de cette quantité on obtint:

a ^o de l'acide ornithurique droit complètement exempt d'acide racémique et correspondant aux fractions A, B et C	17 ^{gr} ,1
b ^o de l'acide ornithurique droit presque exempt d'acide racémique correspondant aux fractions D, E og F	7 ^{gr} ,8
c ^o des mélanges d'acides racémique et gauche, correspondant aux fractions G et H.....	39 ^{gr} ,0
Total...	63 ^{gr} ,9
soit environ 80 ^o /o de la matière première.	

J'ajouterai encore quelques remarques relatives à l'ornithurate droit de brucine. Nous avons vu que ce sel est assez difficilement soluble dans l'eau, même chaude; dans l'alcool il est assez facilement soluble à froid et très soluble à chaud, tandis que dans l'éther il se dissout difficilement. Séché à l'air, le sel renferme environ 1 molécule d'eau de cristallisation, qu'il abandonne dans le vide à 70^o. Laissé au-dessus d'eau, il l'absorbe de nouveau.

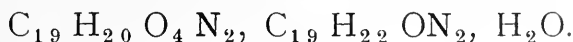
Exposés dans le vide sulfurique, 1^{gr},0052 du sel cédèrent très lentement et incomplètement leur eau de cristallisation; après un abandon subséquent dans le vide à 70^o, on constata du jour au lendemain que le poids restait constant; la perte était de 0^{gr},0263 (2,62^o/o); abandonné sur de l'eau, le sel déshydraté en réabsorba

pendant 24 heures 0^{gr},0256. Un séjour prolongé sur l'eau ne changea pas le poids du sel (teneur en eau calculée pour 1 mol. d'eau 2,39⁰/₀).

0^{gr},2577 de sel déshydraté donnèrent, dans un dosage par la méthode Dumas, 18^{cc},0 d'azote à 21⁰ et sous 738^{mm},3 de pression, correspondant à 7,68⁰/₀ d'azote (calculé 7,65⁰/₀).

Le sel déshydraté fondit nettement à 135—136⁰ (corr.); le sel contenant de l'eau offrit à peu près le même point de fusion, mais avec moins de netteté.

2. Ornithurate gauche de cinchonine.



On pila bien dans un mortier 21^{gr},6 d'acide ornithurique (mélange des acide racémique et gauche des fractions G et H, p. 214) avec 19^{gr},5 de cinchonine (calculé pour molécules égales 18^{gr},7). Puis dans un ballon de 5 l. on mit en suspension le mélange dans 1/2 l. d'eau froide, et l'on versa, en agitant constamment, de l'eau bouillante jusqu'à un volume d'environ 4 1/2 l., ce qui fit entrer en dissolution la majeure partie du mélange. Après avoir chauffé 5 à 6 heures durant au bain d'eau bouillante, et en agitant fréquemment, on filtra la partie restée indissoute (fraction E du schéma p. 217).

Refroidi, le liquide filtré montra bientôt un trouble laiteux, nettement huileux (fraction D du schéma p. 217); cependant en continuant de faire refroidir, tout en agitant énergiquement, on vit bientôt se produire un dépôt cristallin. Dès l'apparition de celui-ci, on transvasa le liquide et les cristaux en suspension dans un autre becherglas, où la cristallisation s'acheva du jour au lendemain. Le joli dépôt blanc, très volumineux, présentait au microscope des faisceaux de cristaux aciculaires, quelques-uns effilés, d'autres plus courts et plus épais. On l'essora à la trompe, puis le lava 3 fois à l'eau froide. Rendement 20^{gr},2 de sel de cinchonine. Les eaux mère et de lavage fournirent la fraction F (v. le schéma p. 217).

De cette manière on traita en tout 39^{gr},0 d'acide ornithurique (v. p. 214), qui fournirent un total de 34^{gr},2 d'ornithurate gauche de cinchonine.

Chauffé avec de l'eau au bain-marie bouillant, le sel de cinchonine fondit, de sorte qu'on put difficilement le faire entrer en dissolution. Il en fut de même quand on y versa de l'eau bouillante. C'est pourquoi on le fit recristalliser de la façon

suivante: Dans un ballon de 5 l. on mit en suspension le sel dans $\frac{1}{2}$ l. d'eau froide; puis, en secouant énergiquement, on y ajouta de l'eau bouillante, jusqu'à ce que presque tout fût entré en dissolution. Ensuite on filtra et fit entrer le reste en dissolution d'une façon semblable. Comme un échantillon prélevé sur la solution, dont le volume total était de 5 à 6 l., ne fournit par réfrigération qu'un dépôt insignifiant, on fit évaporer toute la solution au bain-marie jusqu'à ce qu'on aperçût à la surface une pellicule à demi cristalline; le volume était alors d'environ 3 l.

Après avoir laissé refroidir lentement à l'air, mais en agitant constamment, on eut une augmentation du dépôt moitié solide, moitié huileux. Alors la cristallisation proprement dite commença. En ce moment on transvasa le liquide ainsi que les cristaux qui venaient de s'y déposer, dans un verre à pied où la cristallisation se compléta du jour au lendemain. (La masse à demi liquide et adhérente aux parois de la capsule, constitue la fraction B du schéma p. 217). Le dépôt fort volumineux qui s'était formé, présentait à l'œil nu l'aspect d'écailles à éclat soyeux; en l'examinant au microscope, on vit qu'il se composait de prismes bien développés longs et étroits, souvent obliquement tronqués. On les filtra à la trompe et les lava trois fois à l'eau froide. Desséché à l'air, le sel pesait 16 gr. (fraction A du schéma p. 217); les eaux mère et des lavages donnèrent la fraction C (v. le schéma p. 217).

En partant des différentes fractions, on prépara et analysa l'acide ornithurique comme décrit précédemment pour l'ornithurate droit de brucine (v. p. 211).

2^{gr},3691 de fraction A (dissous dans 4 cc. de lessive de soude 2. normale + de l'eau jusqu'à un volume de 20 cc.) donnèrent une déviation¹⁾ de $\div 2^0 8'$; donc $[a]_D^{20} = \div 9^0,00$; calculé $\div 9^0,10$. Après dilution de 10 cc. de cette solution jusqu'à un volume de 20 cc., la déviation était de $\div 1^0 10'$; donc $[a]_D^{20} = \div 9^0,85$; calculé $\div 9^0,81$.

1^{gr},6467 de fraction B (dissous dans 2^{cc},8 de lessive de soude 2 norm. + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^0 33'$; $[a]_D^{20} = \div 9^0,41$; calculé $\div 9^0,50$.

1^{gr},1582 de fraction C (2^{cc},0 de lessive + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^0 6'$; $[a]_D^{20} = \div 9^0,50$; calculé $\div 9^0,82$.

1^{gr},1825 de fraction D (2^{cc},0 de lessive + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^0 3'$; $[a]_D^{20} = \div 8^0,88$; calculé $\div 9^0,81$.

1^{gr},3159 de fraction E (2^{cc},2 de lessive + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 57'$; $[a]_D^{20} = \div 7^0,22$; calculé $\div 9^0,70$.

¹⁾ Dans cet essai de polarisation comme dans tous ceux qui précèdent et suivent, on s'est servi d'un tube de 2 décimètres de longueur; température 20°.

Schéma de fractionnements de l'ornithurate de cinchonine,

obtenu à partir de 39 gr. d'un mélange des acides ornithuriques gauche et racémique.

34 ^{gr} ,2 de sel de cinchonine cristallisé				
Fraction	Séparé en forme cristalline		Déposé à l'état huileux	Eau-mère
Poids de l'acide ornithurique en grammes ...				
[α] _D ²⁰ trouvé				
[α] _D ²⁰ calculé				
	7,6	a ⁰ ÷ 9 ⁰ ,00, b ⁰ ÷ 9 ⁰ ,85	2,9	5,5
		a ⁰ ÷ 9 ⁰ ,10, b ⁰ ÷ 9 ⁰ ,81	÷ 9 ⁰ ,41	÷ 9 ⁰ ,50
			÷ 9 ⁰ ,50	÷ 9 ⁰ ,82

2^{gr},1532 de fraction F (3^{cc},6 de lessive + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 54'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 4^0,18$; calculé $\div 9^0,20$.

Il ressort du schéma de fractionnements (p. 217) que même le dépôt fourni par la première cristallisation (34^{gr},2) était une combinaison gauche presque pure; car, par recristallisation de ce dépôt, l'eau-mère même a donné un acide gauche presque pur. De plus, le schéma montre que les rendements furent comme suit:

a ^o de l'acide ornithurique gauche complètement exempt d'acide racémique (fractions A et B)	10 ^{gr} ,5
b ^o de l'acide gauche presque exempt d'acide racémique (fraction C)	5 ^{gr} ,5
c ^o des mélanges des acides racémique et gauche (fraction D, E et F)	14 ^{gr} ,7
Total	30 ^{gr} ,7

En y ajoutant

l'acide ornithurique droit obtenu (17^{gr},1 + 7^{gr},8, v. p. 214) 24^{gr},9
et l'acide obtenu en réunissant toutes sortes de restes re-
cueillis au cours de la préparation 12^{gr},2

l'on obtient un rendement total de 67^{gr},8
soit environ 85 % de la matière première (80 gr., v. p. 214).

J'ajouterai quelques remarques concernant le sel de cinchonine de l'acide ornithurique gauche. Nous avons vu dans ce qui précède que ce sel se dissout assez difficilement dans l'eau, même à chaud; il est très facilement soluble dans l'alcool, même froid, tandis que l'éther le dissout avec peine.

Le sel, séché à l'air, renferme près de 1 molécule d'eau de cristallisation, qu'il abandonne assez facilement en séjournant dans le vide au-dessus d'acide sulfurique concentré. Placé sur de l'eau, il l'absorbe de nouveau.

1^{gr},0247 du sel perdirent dans le vide sulfurique pendant 96 heures, en tout, 0^{gr},0227 (2,22 %; la théorie exige 2,76 % pour 1 molécule d'eau); un séjour ultérieur dans le vide tant au-dessus de l'acide sulfurique concentré qu'à 70° ne fit pas augmenter la perte. Placé dans l'air humide jusqu'à ce que le poids n'augmentât plus, le sel absorba 0^{gr},0261 d'eau, ce qui correspond à peu de chose près à 1 molécule d'eau.

Dans un dosage d'après Dumas, 0^{gr},2339 de sel déshydraté donnèrent, à 20°₂ et sous 750^{mm},8 de pression, 18^{cc},8 d'azote, correspondant à 9,02 % d'azote (calculé 8,85 %).

Le sel déshydraté fondit nettement à $154-155^{\circ}$ (corr.). Le sel hydraté avait à peu près la même température de fusion; toutefois, celle-ci ne put être déterminée aussi exactement que dans le cas du sel anhydre.

3. Acides ornithuriques droit et gauche.

Pour tous les essais exposés dans ce qui va suivre, je me suis adressé seulement aux acides respectivement droit et gauche complètement exempts d'acide racémique, c'est-à-dire, en ce qui concerne l'acide droit, aux $17^{\text{gr}},1$ mentionnés à la page 214, et pour l'acide gauche aux $10^{\text{gr}},5$ indiqués à la page 218. Avant de m'en servir, je les ai fait recristalliser l'un et l'autre dans de l'alcool absolu.

On fit dissoudre $15^{\text{gr}},4$ d'acide ornithurique droit dans $180 + 15 + 15$ cc. d'alcool absolu chaud. On sépara, par filtration de la solution, quelques rares flocons. Agitée ensuite, la liqueur laissa tomber, avant même qu'elle fût refroidie, un dépôt abondant et volumineux qui, sous le microscope, affectait exclusivement la forme de cristaux aciculaires. Après repos jusqu'au lendemain, on filtra à la trompe, lava le dépôt 3 fois à l'alcool absolu, et enfin on le dessécha à l'air.

Rendement en acide ornithurique droit pur: $12^{\text{gr}},6$.

En opérant d'une manière semblable, on obtint, à partir de $8^{\text{gr}},6$ d'acide gauche brut et en recristallisant dans l'alcool absolu, $6^{\text{gr}},8$ d'acide ornithurique gauche pur présentant exactement le même aspect que le composé droit.

Abstraction faite du signe du pouvoir rotatoire, les acides ornithuriques droit et gauche se comportaient d'une manière tout à fait identique. Entre les acides optiquement actifs et l'acide racémique, tous les trois à l'état libre, il fut également impossible de découvrir des différences considérables: comme on va le voir, il ne s'en produisit que dans les produits de transformation et dans les sels. Toutefois, entre les acides libres optiquement actifs et l'acide racémique libre, je vais signaler ici quelques divergences, peu importantes, il est vrai, mais qui se manifestaient toujours d'une façon constante.

J'ai montré dans une étude antérieure¹⁾ qu'à l'état brut l'acide racémique séché à l'air ne perdit que très peu de son

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 47 (au bas de la page) (1902).

poids dans le vide à 120° , alors que les produits recristallisés dans l'alcool, puis séchés à l'air, perdirent $1/2$ à $1\frac{1}{2}$ % de leur poids lorsqu'on leur fit subir une dessiccation dans le vide à 120° . D'un autre côté, pour les acides ornithuriques optiquement actifs, c'était l'inverse: séchés à l'air, les acides bruts, c'est-à-dire ceux précipités en milieu alcalin par un excès d'acide chlorhydrique, perdirent toujours, dans le vide à 80° , des quantités d'un poids appréciable (0,1 à 0,4 %), tandis que la diminution de poids correspondante des acides optiquement actifs recristallisés dans l'alcool ne dépassait jamais 0,05 %.

Les acides ornithuriques sont presque insolubles dans l'eau froide et très difficilement solubles dans l'eau chaude. On traita pendant deux à trois heures, en agitant à diverses reprises, 0^{gr},1 d'acide ornithurique droit avec 20 cc. d'eau dans une éprouvette placée dans de l'eau bouillante. Filtrée rapidement à chaud, la solution laissa tomber presque instantanément un beau dépôt cristallin très volumineux, constitué d'acide ornithurique droit vu au microscope, il présentait exclusivement de longues aiguilles aplaties. Il en fut de même pour l'acide ornithurique gauche; mais l'acide ornithurique racémique se déposait beaucoup plus lentement; aussi son dépôt était-il moins volumineux et présentait au microscope des aiguilles plus courtes et plus larges.

L'acide ornithurique droit fondit à $188-189^{\circ}$ (corr.), l'acide ornithurique gauche à 189° (corr.), tandis que l'acide ornithurique naturel fond d'après Jaffé¹⁾ vers 182° (non corr.), suivant Schulze et Winterstein²⁾ vers 184° ; l'acide ornithurique racémique est fusible entre 187 et 188° (corr.)³⁾.

On constata que la rotation spécifique ($[\alpha]_D^{\circ}$) du sel sodique de l'acide ornithurique droit en solution faiblement alcaline est de $+ 8^{\circ},50$ (la solution contenait environ 20 % d'acide ornithurique),

$+ 9^{\circ},29$ (la solution contenait env. 10 % d'acide ornithurique) et

$+ 9^{\circ},95$ (la solution contenait env. 5 % d'acide ornithurique).

La rotation spécifique dépend donc jusqu'à un certain degré de la concentration de la solution.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 10, 1927 (1877).

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 26, 4 (1898).

³⁾ E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 463 (1901), et S. P. L. Sørensen: Ces Comptes-rendus 6, 46 (1902).

Pour le sel sodique de l'acide ornithurique gauche, on trouva dans les mêmes conditions:

$\div 9^0,22$ (la solution contenait env. 10 % d'acide ornithurique).

Enfin, le sel potassique de l'acide ornithurique droit donna en solution légèrement alcaline

$+ 8^0,87$ (la solution contenait env. 10 % d'acide ornithurique).

Le sel potassique a donc un pouvoir rotatoire moindre que celui du sel sodique.

La seule détermination publiée jusqu'à ce jour du pouvoir rotatoire de l'acide ornithurique naturel est due à E. Fischer, qui a examiné une des préparations de Jaffé. Fischer¹⁾ a constaté que la rotation spécifique du sel potassique en solution légèrement alcaline est de $+ 7^0,85$ (la solution contenait environ 10 % d'acide ornithurique). Le chiffre est beaucoup plus bas que celui que je viens d'indiquer. J'ai lieu de croire que cette divergence est due à une teneur en acide ornithurique racémique dans la préparation examinée par Fischer; car, vu l'accord, presque complet sous tous les autres rapports, de l'acide ornithurique naturel avec l'acide ornithurique droit synthétiquement préparé, la constitution de l'acide ornithurique naturel ne peut guère faire de doute.

4 gr,0192 d'acide ornithurique droit pur (dissous dans 6 cc,5 de lessive de soude 2. normale + d'eau jusqu'à 20 cc.) provoquèrent une déviation²⁾ de $+ 3^0 25'$. $[\alpha]_D^{20} = + 8^0,50$.

On dilua d'eau 10 cc. de cette solution jusqu'à un volume de 20 cc. La rotation fut alors $+ 1^0 52'$ $[\alpha]_D^{20} = + 9^0,29$.

10 cc. de cette dernière solution furent étendus d'eau jusqu'à 20 cc. La rotation fut alors $+ 1^0$. $[\alpha]_D^{20} = + 9^0,95$.

2 gr,0598 d'acide ornithurique gauche pur (dissous dans 3 cc,3 de lessive + d'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^0,54'$. $[\alpha]_D^{20} = \div 9^0,22$.

2 gr,0296 d'acide ornithurique droit pur (dissous dans 3 cc,3 de solution d'hydroxyde de potassium 2. normale + d'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $+ 1^0 48'$. $[\alpha]_D^{20} = + 8^0 87$.

0 gr,1571 d'acide ornithurique droit pur donnèrent 0 gr,3856 d'acide carbonique (66,94 % de carbone) et 0 gr,0855 d'eau (6,09 % d'hydrogène).

0 gr,1671 d'acide ornithurique gauche pur donnèrent 0 gr,4114 d'acide carbonique (67,14 % de carbone) et 0 gr,0919 d'eau (6,15 % d'hydrogène).

0 gr,1546 d'acide ornithurique droit pur donnèrent, dans un dosage d'azote par la méthode Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à 12 cc,65 de solution d'hyposulfite $\frac{N}{14,04}$ (8,18 % d'azote).

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 456 (1901).

²⁾ V. la note à la p. 216.

0 gr,1426 d'acide ornithurique gauche pur donnèrent une quantité d'ammoniaque correspondant à 11 cc,75 de solution d'hyposulfite (8,24 0/0 d'azote).

		Calculé	Trouvé	
			Acide ornithurique droit	gauche
C ₁₉	228,00	67,01	66,94	67,14
H ₂₀	20,16	5,93	6,09	6,15
O ₄	64,00	18,81		
N ₂	28,08	8,25	8,18	8,24
		340,24	100,00	

4. Ornithurates droit et gauche de chaux.

En appliquant le mode d'obtention de l'acide ornithurique racémique, procédé décrit antérieurement¹⁾, on prépara les sels de calcium à partir de 1/200 mol.-gr. (1 gr,7) respectivement d'acide ornithurique droit et d'acide ornithurique gauche. Dans l'un et l'autre cas les sels de calcium se précipitaient sous la forme de dépôts blancs caséux apparaissant au microscope comme des agglomérations d'aiguilles extrêmement minces (tandis que les cristaux du sel calcaire de l'acide racémique affectent des formes lamellées). On obtint, dans l'un et l'autre cas, un rendement de 1 gr,6 de sel séché à l'air qui, de même que le sel calcaire de l'acide naturel et contrairement au sel calcaire de l'acide racémique, ne renfermait pas d'eau de cristallisation.

0 gr,8308 d'ornithurate droit de chaux, séchés à l'air, puis abandonnés dans le vide sulfurique, ne perdirent du jour au lendemain que 0 gr,0008, et ensuite, même en desséchant pendant deux jours consécutifs dans le vide à 120°, il n'y eut pas diminution de poids²⁾. — Il en fut de même pour l'ornithurate gauche de chaux.

Pour les analyses suivantes on employait les sels calcaires après dessiccation dans le vide sulfurique.

0 gr,1891 d'ornithurate droit de chaux donnèrent 0 gr,4384 d'acide carbonique (63,23 0/0 de carbone) et 0 gr,0950 d'eau (5,62 0/0 d'hydrogène).

0 gr,2201 d'ornithurate gauche de chaux donnèrent 0 gr,5104 d'acide carbonique (63,24 0/0 de carbone) et 0 gr,1100 d'eau (5,59 0/0 d'hydrogène).

0 gr,2112 d'ornithurate droit de chaux fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 16 cc,35 de solution d'hyposulfite (7,74 0/0 d'azote).

0 gr,1726 d'ornithurate gauche de chaux fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 13 cc,35 de solution d'hyposulfite (7,73 0/0 d'azote).

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 49 (1902).

²⁾ Comp., pour le sel calcaire de l'acide racémique, l'endroit cité, p. 50—52.

		Calculé	Trouvé	
			Composé droit	gauche
C ₃₈	456,00	63,46	63,23	63,24
H ₃₈	38,30	5,33	5,62	5,59
O ₈	128,00	17,81		
N ₄	56,16	7,82	7,74	7,73
Ca	40,10	5,58		
	718,56	100,00		

5. Ornithines monobenzoyliques droite et gauche.

En suivant le même procédé que celui employé pour l'acide ornithurique racémique¹⁾, on prépara les ornithines monobenzoyliques à partir respectivement de $\frac{1}{80}$ mol.-gr. (4^{gr},25) d'acide ornithurique droit et de $\frac{1}{100}$ mol.-gr. (3^{gr},4) d'acide ornithurique gauche. Toutefois, pour neutraliser l'acide chlorhydrique, on n'a pas employé l'eau ammoniacale, mais une solution d'hydroxyde de sodium, parce que l'eau-mère des ornithines monobenzoyliques devait servir à la préparation des combinaisons d'isocyanate de phényle et, partant, ne devait pas contenir d'ammoniaque.

Les deux ornithines monobenzoyliques droite et gauche se déposèrent sous la forme de précipités blancs caséux présentant au microscope des agglomérations de fines aiguilles extrêmement minces; une nouvelle cristallisation dans de l'eau fit précipiter de nouveau ces composés sans en changer l'aspect.

Le rendement en composé dr. recristallisé fut seulement de 0^{gr},34
 - - - - - g. - - - - - 0^{gr},22

Les composés optiquement actifs cristallisent donc sous forme de fines aiguilles, exactement comme indiqué par Jaffé²⁾ et par Schulze et Winterstein³⁾ relativement au composé monobenzoylique de l'ornithine naturelle, tandis que l'ornithine monobenzoylique cristallise en lamelles⁴⁾. Conformément à cela, 0^{gr},04 de composé dr. + 0^{gr},04 de composé g., dissous dans 2 cc. d'eau chaude, puis refroidis, fournirent la combinaison racémique en quantité abondante, sous la forme d'un joli

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 52 (1902).

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 11, 408 (1878).

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 26, 5 (1898).

⁴⁾ E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 463 (1901), et S. P. L. Sørensen: l'endroit cité.

précipité présentant même à l'œil nu de beaux feuilletts cristallins, qui sous le microscope affectaient tous la forme de lamelles quadrilatères et hexagonales bien développées.

Le point de fusion de ces composés ne peut pas être déterminé avec exactitude; les deux formes optiquement actives noircirent à $225-230^{\circ}$, puis suintèrent à $235-240^{\circ}$, pour entrer en fusion complète, avec dégagement d'air, un peu au-dessus de 240° (corr.), ce qui concorde assez bien avec les indications relatives au point de fusion de la combinaison monobenzoylique de l'ornithine naturelle (Jaffé: 225 à 230° ; Schulze et Winterstein: 225 à 240°). La combinaison racémique obtenue par recristallisation de parties égales des deux formes optiquement actives, présentait un point de fusion un peu plus élevé: car elle ne suinta qu'à 240 à 245° , puis fondit complètement avec dégagement gazeux, à 250 ou 251° (corr.); pour le composé racémique pur recristallisé, j'ai antérieurement trouvé le point de fusion $255-260^{\circ}$ (corr.).

$0^{\text{gr}},0693$ d'ornithine droite monobenzoylée fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à $8^{\text{cc}},10$ d'hyposulfite ($11,69\%$ d'azote; calculé $11,89\%$).

$0^{\text{gr}},0955$ d'ornithine gauche monobenzoylée donnèrent une quantité d'ammoniaque correspondant à $11^{\text{cc}},40$ de solution d'hyposulfite ($11,94\%$ d'azote).

Les préparations séchées à l'air ne perdirent rien de leur poids par dessiccation dans le vide à 70° .

6. Combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne des ornithines droite et gauche.

a. Combinaisons d'isocyanate de phényle. Pour préparer ces composés, on se servit de l'eau-mère des ornithines monobenzoylées, qu'on fit évaporer au bain-marie, puis traita par l'acide chlorhydrique concentré, tout à fait de la même manière que décrit antérieurement¹⁾ pour la combinaison racémique. Après avoir éliminé au moyen d'éther la dernière trace d'acide benzoïque, on fit subir à la matière le même traitement qu'antérieurement indiqué, c'est-à-dire par l'hydroxyde de sodium et par l'isocyanate de phényle; puis on fit précipiter par une légère sursaturation d'acide chlorhydrique. Le composé racémique se déposa alors sous forme d'un précipité blanc, caséeux, microcristallin²⁾, tandis que

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 54 (1902).

²⁾ A l'endroit cité, p. 55.

les formes optiquement actives donnèrent des précipités blancs, presque gélatineux, très volumineux, et dont l'aspect microscopique était tout à fait amorphe. Cependant, abandonnés jusqu'au lendemain avec l'eau-mère légèrement chlorhydrique, les précipités subirent des changements considérables, diminuant beaucoup de volume et prenant une consistance plutôt caséeuse; vus au microscope, ils offraient maintenant des agrégats de cristaux aciculaires. Après les avoir filtrés à la trompe, on priva les précipités de leur chlore en les lavant à l'eau froide; enfin on les dessécha à l'air.

Le composé droit fournit..... 3,5 gr.

- — gauche — 2,9 -

ce qui dans les deux cas, en tenant compte des ornithines monobenzoylées déjà obtenues, se monte à plus de 85 % du calcul.

Le composé d'isocyanate de phényle racémique peut aisément se recristalliser dans l'alcool à 40 %, d'où il se dépose sous forme de jolies lamelles cristallines¹⁾. Il n'en est pas de même pour les combinaisons optiquement actives, qui ne donnent qu'une précipitation de masses gélatineuses.

0^{gr},2 du composé droit se sont dissous à limpidité dans 15 cc. d'alcool à 40 % portés au bain-marie. Après refroidissement, puis deux ou trois heures de repos, avec des agitations fréquentes, le composé droit commença à se déposer de nouveau en une masse gélatineuse et presque limpide comme l'eau. Même après deux jours, pendant lesquels on agitait assez fréquemment, toute la masse formait une gelée à peu près figée et dans laquelle le microscope révéla à peine un commencement de cristallisation.

0^{gr},2 du composé gauche, dissous dans 15 cc. d'alcool à 40 %, se comportaient de la même manière.

En chauffant ultérieurement au bain-marie, on fit redissoudre les deux composés droit et gauche. On fit des deux solutions limpides un mélange, dont le composé racémique commença à se déposer avant même que le liquide fût refroidi. Le dépôt blanc composé de beaux cristaux, présentait au microscope une agrégation de lamelles ressemblant à celles qu'avait donné antérieurement le composé racémique. Le rendement en composé rac. était de 0^{gr},32.

Nous avons donc constaté que les combinaisons d'isocyanate de phényle des formes optiquement actives se cristallisent très difficilement, tout comme R. O. Herzog²⁾ l'a constaté dans le cas des combinaisons préparées par lui à partir des ornithine et

¹⁾ A l'endroit cité, p. 56.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 34, 525 (1902).

lysine naturelles. J'ai pu confirmer antérieurement¹⁾ l'indication de Herzog en ce qui concerne la lysine naturelle. En même temps j'ai démontré que les ornithine et lysine racémiques fournissent des composés d'isocyanate de phényle facilement cristallisables et, conformément, C. Neuberg et M. Silbermann²⁾ ont signalé ce fait que la combinaison d'isocyanate de phényle de l'acide α - β -diaminopropionique rac. est un composé facilement cristallisable. En conséquence, il semble que tous les acides diaminocarboniques se comportent de cette manière.

Les combinaisons d'isocyanate de phényle brutes des formes optiquement actives, n'étaient pas tout à fait pures; car même après dessiccation dans le vide à 70°, opération qui leur fit perdre 0,3 à 0,4 % de leur poids, on trouva une teneur en azote inférieure aux 15,16 % indiqués par le calcul, à savoir pour le composé droit 14,67 %, pour le composé gauche 14,80 %. Par contre, les 0^{gr},32 (voir plus haut) de composé racémique obtenus par recristallisation de parties égales des deux formes optiquement actives, étaient parfaitement purs; ils accusaient une teneur en azote de 15,06 %, et leur point de fusion était compris entre 189 et 190° (corr.)³⁾.

0^{gr},1036 fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 15^{cc},60 de solution d'hyposulfite (15,06 % d'azote).

b. Combinaisons d'hydantoïne. En opérant tout à fait comme décrit antérieurement⁴⁾ pour la combinaison racémique, on prépara les combinaisons d'hydantoïne optiquement actives à partir de 2 gr. de composé droit d'isocyanate de phényle et d'une même quantité du composé gauche correspondant. On obtint 1^{gr},65 du composé d'hydantoïne droit et 1^{gr},60 du composé gauche, sous forme de dépôts caséeux blancs, présentant au microscope des masses microcristallines, entremêlées de quelques rares cristaux nettement aciculaires. Les composés d'hydantoïne bruts n'étaient pas tout à fait purs: le composé droit, dont le point de fusion était compris entre 190 et 191° (corr.), accusait une teneur en azote de 15,59 % (le calcul avait indiqué 15,94 %),

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus, 6, pages 55, 58 et 61 (1902).

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 344 (1904).

³⁾ Ces mêmes Comptes-rendus, 6, 56 (1902).

⁴⁾ Ibid. 6, 56 (1902).

tandis que celle de l'autre composé, fusible à 191° (corr.) était de 15,77 %. Ils se recristallisèrent tous deux dans l'alcool absolu chaud; refroidis ensuite, ils se précipitèrent à l'état pur sous la forme de dépôts blancs volumineux, où le microscope révéla l'existence de faisceaux d'aiguilles enchevêtrées, très fines et très minces. Selon R. O. Herzog¹⁾, le composé d'hydantoïne obtenu à partir de l'ornithine naturelle offre le même aspect. Les points de fusion des formes racémiques et de celles optiquement actives sont très rapprochés l'un de l'autre: pour celle préparée au moyen de l'ornithine naturelle, Herzog indique 191 à 192° (non corr.); ayant antérieurement trouvé celui de la combinaison rac. pure: $194-195^{\circ}$ (corr.), j'ai maintenant constaté que le composé droit pur fond à $194-195^{\circ}$ (corr.), le composé gauche pur à $195-196^{\circ}$ (corr.).

Séchés dans le vide à 70° , les composés purs ne perdirent rien de leur poids. Ils accusaient une teneur en azote de 15,92 % (le composé dr.) et de 15,81 % (le composé g.); la théorie avait donné 15,94 %.

0 gr, 1294 du composé droit d'hydantoïne fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 20 cc, 60 de solution d'hyposulfite (15,92 % d'azote).

0 gr, 1800 du composé gauche donnèrent une quantité d'ammoniaque correspondant à 28 cc, 46 de solution d'hyposulfite (15,81 % d'azote).

Il résulte de ce qui précède que l'acide ornithurique naturel pur se comporte tout à fait comme l'acide α - δ -dibenzoyl-diamino-valérique droit (laissant de côté le peu de différence de rotation spécifique, p. 221). Les deux acides doivent donc être considérés comme identiques.

Abstraction faite du pouvoir rotatoire, les différences les plus essentielles entre l'acide ornithurique racémique, d'une part et, de l'autre, les formes optiquement actives, peuvent se résumer comme suit:

1^o Le sel calcaire de l'acide ornithurique racémique cristallise en formes lamellées renfermant 1 molécule d'eau de cristallisation par atome de calcium; les sels calcaires des formes optiquement actives cristallisent en aiguilles et ne renferment pas d'eau de cristallisation.

¹⁾ A l'endroit cité.

2⁰ Le dérivé monobenzoylé de l'ornithine racémique cristallise en lamelles, tandis que les combinaisons optiquement actives correspondantes cristallisent en aiguilles; le point de fusion de ces dernières est nettement inférieur à celui du composé racémique.

3⁰ La combinaison d'isocyanate de phényle de l'ornithine racémique cristallise facilement en formes lamellées, tandis que les combinaisons optiquement actives correspondantes ne cristallisent que difficilement et en aiguilles.

En mars 1905.

ON THE PROTEINE SUBSTANCES OF BARLEY,
IN THE GRAIN ITSELF
AND DURING THE BREWING PROCESSES.

BY
H. SCHJERNING.

A good many years have elapsed since I conceived the idea of setting on foot a series of investigations with the object of studying, from a quantitative point of view, the appearance — formation and transformation — of the so-called proteine substances during the series of processes going on from the formation of the barley corn on the mother-plant till its ultimate transformation into finished and ready stored beer.

It is true that in its broad features this series of transformations are pretty well known, since the doctrine of the change of matter in plants, on the one hand, and, on the other, our actual knowledge of the action of enzymes may help us to form a notion of the direction which the transformation of proteids will take at almost any point of the course of developments and conversions alluded to. But as regards the quantitative aspect of the processes in question, the case is quite different: of these we know next to nothing, at any rate as far as the proteids properly so called are concerned.

From the preliminary experiments inaugurated by me in the year 1892 it became evident, however, that the time for instituting researches of this kind was not yet come, for the simple reason that the analytical methods, current or known at that time, for the separation of the different proteine individuals or groups of proteids had not yet been sufficiently tested — either in point of quantitative accuracy or in regard to the relations between individual precipitations — and, consequently, could not be relied upon in researches of the kind here referred to.

It was this negative result which, in subsequent years, led me to set to work with the task of submitting the quantitative precipitation of proteine substances to a thorough and comprehensive investigation, with a view to subsequently devising, on the basis of the results arrived at, a method enabling me to determine with quantitative exactness — within reasonable limits, of course — the amounts of the various proteids or groups of proteids co-existing in a solution. The results of these researches, which I published in a series of short memoirs¹⁾, showed that a quantitative analytical determination of the proteine substances is really possible, providing we make constantly use of certain definite precipitants of proteids which not only exhibit constant conditions of precipitation towards the same proteids, even if these are derived from different sources, but also bear the same relation to one another. As for the analytical method itself, I described it in a separate short memoir²⁾.

On the basis of this method I believe it to be possible to estimate the amounts of one or two real albumins³⁾, further of denucleïn, proteoses or albumoses, real peptones, and, as a differential estimation, all non-proteine nitrogenous substances, that is, ammonia and the amine-amid combinations. Thus the way had been prepared for an experimental investigation into the problem, and I felt warranted in hoping to gain an insight into some at least of those many open questions which we meet with in this field of inquiry.

It was at once clear before me that a considerable amount of experimental materials had to be procured before there could be any question of obtaining positive results. For this reason the problem was in the outset planned and divided under the following three sections: —

- I. Formation and transformation of proteine substances during the growth, ripening and storage of barley.
- II. Conversion of proteine substances during malting and storage of malt.

¹⁾ Zeitschr. f. analyt. Ch. **33**, 263 (1894); **34**, 135 (1895); **35**, 285 (1896); **36**, 643 (1897); **37**, 73 (1898); **39**, 545 (1900).

²⁾ *Ibid.* **37**, 413 (1898).

³⁾ In order not to prejudge any part of the question, I have used the designations »Albumin I« and »Albumin II« throughout.

III. Conversion of proteine substances during the series of processes going on in the preparation of wort and its further transformation into ready-stored beer.

In all three sections I have endeavoured to carry out the experiments and make the calculations in such a manner that all the results admit of being re-calculated on a determinate fundamental unity. Further details will be given when we come to describe the modes of working used in each section.

FIRST SECTION.

On the Formation and Transformation of Proteine Substances during the Growth, Ripening and Storage of Barley.

1. Introduction.

The question relating to the occurrence of nitrogenous organic matters in the cereals, and more especially in barley, has for a long time past played a prominent part in both professional and scientific literature, and still, after all, it cannot be claimed that, in any essential particular, it has led to what might be properly called a scientifically established settlement. The reason why it is so is not difficult to find, if I am justified in asserting that the foundation of such a better insight was never yet laid. In order to get at the bottom of the matter, it will be necessary for us to have at our command some analytical methods enabling us to follow, step by step, the transformation, of course quantitatively, of each proteine substance. As, in my opinion, the quantitative method referred to above offers a considerable amount of precision in this respect, it follows that the task does not any longer appear to be a hopeless one.

If we look at the results hitherto gained, it at once becomes conspicuous that, whenever there is a question of the nitrogenous organic substances contained in barley — and more especially in malting barley —, it is almost always the total amount of nitrogen that is referred to, just as if this one factor could settle the whole matter. It is only quite exceptionally

that the view has been advanced that there is also a qualitative or, to put it more exactly, a qualitative-quantitative aspect of the question which requires careful consideration. Still, it is by no means unimaginable that it is in this particular direction that we have to look for the solution of the problem.

We cannot here undertake to give a detailed summary of the — one is tempted to say crowding — literature which deals with the problem as to the nitrogenous matter of malting barley and the allied questions. Such a survey would, as far as I can see, carry us too far into the purely bibliographical field, and, moreover, would not much advance the solution aimed at. It may suffice to point out the leading features of the question.

The investigator by whom the latter was first made the subject of thorough-going consideration was A. Nowacki¹⁾, whose researches deal particularly with the development and physiology of the wheat-grain. They soon, and with perfect justice, attracted the general attention of chemists, and to this day their great significance is undisputable, it being obvious that they really form the foundation of the question relating to the nitrogenous matter of malting barley as well. Nay, the nitrogen problem of malting barley may even plausibly be said to have thus far formed an echo of Nowacki's researches on the wheat-grain.

In Denmark the first to raise the question was the well-known brewer J. C. Jacobsen²⁾, the founder of the Carlsberg Fund, who in a discourse delivered in the year 1870 called the attention to the desirability of clearing up scientifically the cause or causes to which the difference of structure between "mealy" and "vitreous" or "steely" corns of barley is to be traced. This discourse did good service, in that it gave rise to a long series of investigations.

Nowacki³⁾, in regard to the wheat-grain, had asserted that the mealy corn contained a larger quantity of air, imprisoned between the starch granules, than the vitreous corn; and exactly the same result was arrived at by Grønlund⁴⁾ in the case of the barley corn. The first to really clear up the

¹⁾ Untersuchungen über das Reifen des Getreides. Halle 1870.

²⁾ Tidsskrift for Landøkonomi. 1870. p. 269.

³⁾ *loc. cit.*

⁴⁾ Tidsskrift for Landøkonomi. 1880. p. 412.

matter was, however, Samsøe Lund¹⁾, who showed the mealy nature of a barley corn to be conditioned by the presence of a larger quantity of air imbedded between the cell-contents and cell-wall.

With regard to the physical and chemical divergence between soft and hard barley, different views were set forth in the course of a few years. Of these one may be mentioned here, namely the assumption that the mealy barley-corn contains a smaller amount of proteine than the vitreous one.

As regards the question as to whether the mealy corn is *per se* to be preferred over the vitreous one for malting purposes, it is to be noted, that it was proved at an early period, that the vitreous corn, on being steeped in water, will turn mealy. Hence it followed naturally, that the contrast between "mealy" and "steely" could not well be retained as a criterion of the quality of malting barley.

To this day much dissension obtains as to the question whether barleys rich or poor in proteine matter are better suited for malting purposes, just as the above-mentioned relation between the mealy nature of a corn of barley and its amount of proteine matter is still a vexed question. Many, both scientists and industrials, are of a decided opinion that a barley poor in proteine matter possesses a greater value for malting purposes than one rich in this matter, it being also assumed that mealy barleys are less rich in proteids than steely ones; one is even tempted to say that some show a tendency to assign to these two propositions the immutable character of laws of nature. It is noteworthy, however, that not a few *savants* and also industrials take a different, or even diametrically opposed, view. Thus, so far as chemical science is concerned, the matter is in fact still as obscure as it was at the very outset, whereas industrials appear to have made something out of it, chiefly by making a comparison between the demands made in regard to the amount of proteine matter of good malting barleys in the various beer-producing countries. R. Wahl, in a number of pa-

¹⁾ *Ibid.* 1881. p. 442; *vide* also W. Johannsen. *Comptes rendus des Travaux du Laboratoire de Carlsberg* 2, 60 (1884). — In this connection the important researches and publications of G. Holzner deserve also to be mentioned, and more particularly the excellent work "Beiträge zur Kenntniss der Gerste" by Lermer & Holzner. Munich 1888.

pers¹), trenches upon the question as to the relation between the nitrogen content of barley and its value as malting barley. Wahl reports some experiments made by him on an industrial scale in support of his assertions; but I fail to see how his experiments can be conclusive of the question before us. Far more interest attaches to the varied opinions published by several experts and collected in the first article of Wahl. He is undoubtedly justified in drawing from these opinions the conclusion, that, according to experience, we are by no means warranted in asserting that barleys rich in nitrogen are not so fit for malting purposes as those poor in nitrogen. To this, however, the objection may be made, that experience is often based as much upon the evidence of individual sense-perception as upon that of purely experimental observation, so that experience relating to one and the same object may differ in different places, according to local requirements. Suppose for example that malt and beer were prepared in exactly the same manner both in Copenhagen and Chicago from a particular sample of barley. It would then be possible that in one of the two places the product was given the mark "Excellent", whilst in the other place it got only the simple mark "Good", for the plain reason that the demands made in either locality in point of flavour, appearance, keeping powers etc. are not the same. Thus, in this instance, we obtain two somewhat discordant final results; but the discrepancy is not due to the object in itself — the barley — but to the dissimilarity of local requirements.

It is curious to note, however, that in England and America barleys containing a great, or at any rate comparatively great, amount of nitrogen are generally considered to be the best suited for malting purposes, whereas the representatives of the Munich type prefer barleys having a middling nitrogen-content (about 1.64 % N.), the representatives of light-coloured continental beers maintaining, in their turn, that barleys poor in nitrogen are to be regarded as the best raw material.

If we are to state briefly what may be safely considered as established facts with regard to the reciprocal relations between the three factors mealiness, nitrogen-content and quality of malting barley, we may sum up as follows: —

¹) Americ. Brew. Review **18**, 89 etc. (1904).

- (1) Hard barley, on being steeped in water, passes more or less completely into soft barley¹⁾.
- (2) Among barley-crops of one and the same plot of land steely corns contain more nitrogen than mealy ones. If, on the other hand, we have to do with barley-crops from different fields, it appears that the relation of mealy or steely nature to nitrogen-content cannot in that way be tied down to rule²⁾. Hence, from the total nitrogen-content of barley it cannot be inferred with certainty whether it is mealy or vitreous; neither will the reverse conclusion hold.
- (3) It has not been proved either scientifically or experimentally that the quality of malting barley depends on its total amount of nitrogen.

It will be seen that this quantitative method of valuing malting barley according to its nitrogen-content is not established on a very solid foundation. It was therefore natural to feel our way one step further, in order to try if the difficulty could not be settled by a combination of a qualitative and a quantitative method.

This is indeed the course taken by A. Kukla³⁾ in a whole series of memoirs, and, subsequently, E. Prior⁴⁾ and Jalowetz⁵⁾ have expressed themselves to much the same effect.

Kukla is inclined to assume that nitrogenous substances play at least as important a part in the valuation of barley and malt as carbonic hydrates; besides, however, he has a clear understanding that it is not the total amount of nitrogen that is the main point of consideration. He is of opinion that the difference is to be sought in the ratio between certain proteine substances, namely the ratio of coagulable to non-coagulable matter. He defines this ratio more precisely by the enunciation, that the greater the proportion of non-coagulable proteine substances in barley, the less is it fit for malting purposes. Taking

¹⁾ Petri: Aarsber. om det kgl. danske Landhusholdningsselsk. Virks. 1870. p. 53. — C. Grønlund: Tidsskr. for Landøk. 1882, p. 654. — W. Johannsen: Die landwirtschaftl. Versuchsst. **35**, 19 (1888). — L. Just & H. Heine: *Ibid.* **36**, 269 (1889).

²⁾ C. F. A. Tuxen: Tidsskr. for Landøk. 1881, p. 240. — L. Just & H. Heine: Die landwirtschaftl. Versuchsst. **36**, 269 (1889).

³⁾ Zeitschr. f. das gesammte Brauw. **23**, 418, 427, 442, 457, 493, 513, 525. (1900).

⁴⁾ Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabr. **32**, 593 (1904).

⁵⁾ *Ibid.* **32**, 567 (1904).

his departure from this entirely novel point of view, Kukla propounds a whole system of valuation of both barley and malt, and even trenches upon the question as to the influence exerted by conditions of soil and climate on the proportion of non-coagulable proteids. Although it seems to me that the work of Kukla is founded on rather an unsafe basis — the estimation of coagulable proteids with quantitative exactness —, still it holds out a new prospect, namely the abandonment of purely quantitative methods for a combination of a quantitative and a qualitative one; to my mind, this means a great step in the right direction.

I believe, indeed, I am fully justified in questioning, as I have done above, the reliability of the quantitative estimation of the coagulable proteids in barley extracts, or even in proteid solutions generally. It is well known that the power of coagulation of a proteine substance and the temperature at which the coagulation occurs depend on other factors than the chemical nature of the particular proteid, such as for instance the proportion of inorganic matter, free acids and free bases contained in the solution¹). In the particular case under discussion, barley extracts, there is another drawback to the matter. The fact is that the aqueous extract indubitably contains two coagulable proteids²), one of which (leucosine) coagulates at 52°, whilst the other (edestine) does not coagulate at temperatures below 90° and only partially at higher temperatures. The inference to be drawn from this circumstance with regard to the basis of Kukla's system seems to me obvious, and the more so as, according to a private communication he has made me, he estimates the proportion of coagulable proteids by adding five or six drops of acetic acid to 100—200 cc. of barley extract and boiling this mixture for thirty minutes. The leucosine is not likely to coagulate, when we consider the results recorded in the above-mentioned publications, and the statements of Osborne render it unquestionable that edestine only coagulates to

¹) For information on the coagulation of albuminoids I may refer to Otto Cohnheim's: *Chemie der Eiweisskörper* 1904, p. 130—134, and to E. Varenne: *Bull. soc. chim.* **45**, 427 (1886); Van Slyke & B. Hart: *Amer. chem. J.* **33**, 461 (1905).

²) B. Osborne: *Report. Conse. Agricult. Experiment. Station.* 1894, p. 165, V. Griessmayer: *Die Proteide.* 1897, p. 171.

a certain extent. In other words, we cannot attach any value to Kukla's estimation as a basis of a quantitative valuation.

It has hitherto been currently believed that, in judging the quality of malting barley, peculiar importance had to be attached to the chemical composition of the dry substance of barley. In any view of the matter, we shall, to the best of my understanding, sooner or later have to relinquish this view¹). A valuation by the physical and physiological properties of the barley will in every case be legitimate and possess a certain general validity, whereas a valuation founded upon the chemical composition of the dry substance is not likely, in my opinion, to be generally received at any time²), for the plain reason that the modes of working used in malting — which are in many respects widely different among themselves — must needs be conclusive of the question as to which sort of barley is best suited to local requirements. If we are to arrive at a clear insight into the significance possessed by the chemical composition of the dry substance of barley with regard to the value of malting barley, it will be necessary to investigate the chemical transformations or modifications which occur in barley during the course of the processes which take place from the formation of the barley-corn in the mother-plant till the ultimate conversion of the barley into ready stored beer. At the same time we must also try to detect the laws to which those transformations are subject.

The present work is an attempt to throw some light on this question, more especially with regard to the transformation of nitrogenous organic substances³). It is a great and wide-ranging problem, which will surely demand a great deal of time and work and give rise to much discussion before a final result

¹) Some recent researches by E. Prior show that the mode actually current in Northern Germany of valuing malting barley is not, at any rate, satisfactory with regard to Austrian barleys. *Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabr.* **33**, 412 (1905).

²) For this reason I esteem that the Bavarian system of valuation is more generally applicable than that of the Berlin Station or that proposed by Haase. Comparative inquiries into these three systems were made by C. Bleisch and F. Wagner: *Zeitschr. f. d. ges. Brauw.* **27**, 153 (1904).

³) On carbohydrates see H. Jessen-Hansen: *Compt.-rend. des Travaux du Laborat. de Carlsb.* **4**, 69 (1896).

can be arrived at. But, at all events, I feel confident that the way which will lead up to the goal of our endeavours is the one here indicated.

2. Methods of Working.

The necessary particulars concerning the cultivation of each sample of barley will be briefly given under each experiment. In this place we have only to describe the way in which the samples were taken and each analytical value determined.

The different stages of ripeness were characterized as follows:¹⁾ —

Green-ripeness. Upper leaves green, lower leaves yellow or withered. All the nodes juicy. The corns pale-green, with contents soft as wax and easily detached from the husk. Corns easily crushed. Awns green throughout.

Yellow-ripeness. All the leaves are withered. The lower nodes dry, the upper juicy. Awns greenish yellow, almost without chlorophyll. Corns yellowish with greenish ventral furrow; are not easily crushed.

Full-ripeness. The chlorophyll has entirely vanished, not only from the leaves, but also from the corns and awns.

The samples were taken in the following manner: — On the day when the suitable degree of ripeness had been reached, a convenient number of ears were cut off early in the morning from normally developed plants. The corns were then immediately picked out of the ears and freed from awns and glumes, as also from any impurities and small or broken corns which they might contain, for which purpose the sample, whilst blowing air upon it, was shaken well in a sieve having 32 meshes to each 10 cm. This work was accomplished before noon, so that I had ample time to begin the total analytical work on the very same day. These measures are quite indispensable to obviate transformations in the materials submitted to experiment. Another mode of proceeding, by which such transformations could be prevented, cannot be imagined, as it must be constantly borne in mind that it is the proteine substances with which we are concerned. The possibility of kill-

¹⁾ The mode of characterization here adopted is the same as that used at the Copenhagen Agricultural College.

ing the vital functions of the corns by heating or by chemical reagents — such as for instance alcohol, salts, etc. — had to be precluded at the very outset.

Some of the barley samples had also to be examined with regard to the influence of storage on proteine substances, independently of the general investigation into the question as to ripening. For this purpose the requisite quantity of corns were taken out and subjected to the preliminary treatment and cleansing described above. For the first five to six days the samples were stored on filter-paper in a dry room, where they were exposed to the direct action of day-light; for the rest of the time they were stored in a capacious powder-glass bound over with a layer of filter-paper. During the whole length of the storage time — excepting the first five or six days — the sample was kept in an obscure place at the ordinary temperature of the laboratory, and at least once a week it was shaken well.

Before we go on to the description of the analytical methods used, it is necessary to state, that the unity for which all the experimental results in this section have been calculated is constantly 10,000 corns.

The only fairly constant factor that can be taken for a fundamental unity in experiments concerning the ripening of barley is doubtless one corn. The amounts of dry matter, mineral constituents, nitrogen *etc.*, vary indeed from one stage of development to the next. The only thing which remains constant is the individual corn: one corn is and remains one corn during the whole course of development. If therefore, notwithstanding this, I speak under correction — as I have done above — with regard to this unity also, it is owing to the circumstance that the size of the corns is in itself very variable, even at the same stage of development. Accordingly it is not indifferent either — at any rate as far as the dry matter is concerned — whether the results of the experiments be calculated for 100 of the biggest or 100 of the smallest corns. With a view to eliminating as far as possible the source of error which would necessarily be the consequence of too much heterogeneousness in the size of corns, I have purposely cleansed the materials by means of the sifting process mentioned above. We evidently obtain by this means considerably more uniformity in the size of corns, which in its turn has this further advantage, that the error of

unity will probably be so small as not to affect the results to any material degree. My aim in taking 10,000 corns for a unity is, of course, simply to give the calculated figures a suitable magnitude.

When the results of the analyses are to be re-calculated for a definite corn unity, it will be necessary to get to know with sufficient accuracy the average weight of one or more corns and also the amount of dry matter contained in the corn. We shall then be able to make the requisite re-calculations in a satisfactory manner.

I have used two slightly different methods of working in the experiments.

Method I.

In the first ripening experiment — year 1901 — the analytical determinations were made in the following manner:—

The corn weight is determined by weighing, in a previously tared platinum dish, 100 whole corns counted out indiscriminately. The weight found multiplied by 10 gives the weight of 1000 aqueous corns = a gr.

Dry matter, or more properly water, is estimated by weighing out into a weighing glass with glass stopper 200 whole corns counted out at random, and then drying them for three days in a vacuum — pressure 18 to 20 mm. — at 100° . From the loss of weight is calculated the percentage of dry matter = b %.

Some figures bearing out the trustworthiness of this method are recorded in the following table.

TABLE I.

Dried in a vacuum at 100°	% of water.									
1 day . . .	68·73	62·63	56·26	48·27	12·39	11·48	—	—	—	—
2 days . . .	68·98	63·15	56·70	48·85	12·94	12·06	—	—	11·86	11·70
3 „ . . .	69·07	63·35	56·89	49·01	13·26	12·39	12·65	12·60	12·10	11·97
4 „ . . .	69·12	63·43	57·00	—	13·38	12·53	12·72	12·66	12·25	12·12
5 „ . . .	69·15	63·49	57·06	—	13·52	12·67	—	—	—	—

By calculating from these results the mean values of the differences from day to day we shall get a clearer picture:

Loss of water from 1st to 2nd day 0·49 %
 „ „ „ „ 2nd „ 3rd „ 0·23 „
 „ „ „ „ 3rd „ 4th „ 0·10 „
 „ „ „ „ 4th „ 5th „ 0·09 „

I believe these figures must be interpreted as follows: —

After three days' drying, the water present has evaporated. By further drying, still more water evaporates, it is true, but this loss is not attributable to moisture or, so to speak, mechanically bound water, but, on the contrary, to chemically bound, or hydrate-, water. This assumption is favoured by the circumstance that the loss of water per cent, after the three days' drying, appears to be very nearly proportional to the time of drying. On this account I have thought it convenient not to dry the corns for more than three days.

It is to be observed, however, that, for the sake of preventing gelatinization of the starch — which would of course have greatly protracted and rendered precarious the whole drying process —, the temperature in the vacuum apparatus was not allowed to exceed 50° during the first four to five hours; it was not until the greater part of the water had evaporated that the temperature was raised to 100° .

The total amount of nitrogen was estimated by the method of Kjeldahl, for which purpose 5×20 or 4×25 whole corns, which had been counted out at random, were treated in 5 or 4 flasks respectively. It is found that 100 corns of barley contain a total amount of nitrogen $\approx c.$ cc. $\frac{1}{10}$ normal acid¹⁾.

Ash, or mineral matter, is estimated in 200 whole corns arbitrarily counted out, which are placed in a thoroughly heated porcelain crucible, dried for 20 hours in a common hot air-bath (at from 50 to 105°), and then incinerated at the lowest possible temperature. When the ash has become grayish or grayish white, it is moistened thoroughly with a solution of ammonium nitrate²⁾, dried, and heated to whiteness. Finally, it is made glowing hot for a quarter of an hour in a blowing-lamp. 200 barley corns yield d gr. ash.

Under these circumstances it may be possible that a little alkali passes away during the heating, but phosphoric acid can hardly be lost³⁾; in order to make this error as constant as possible, I have taken due care, in all the estimates, to heat over

¹⁾ Here and in the sequel, the sign \approx means "corresponding to".

²⁾ The ammonium nitrate solution used was prepared by neutralizing concentrated pure nitric acid with concentrated pure ammoniacal water.

³⁾ Since the ash mixed up with water constantly showed a marked alkaline reaction.

the blowing-lamp exactly one quarter of an hour. Add to this that the determination of the mineral constituents was mainly made for the purpose of affording a kind of control of the relations of the individual experiments among themselves, taking it for granted that this quantity increases more or less during the growth of the corn, and finally (at full-ripeness) becomes constant and keeps constant during storage.

It will be necessary to describe in some detail the manner in which the various nitrogenous substances were dissolved and estimated. Of the barley sample cleansed in the above mentioned manner 50 gr. were accurately weighed out, crushed and finely grated, as far as this could be done in a porcelain mortar; in those cases in which the amount of water was so slight as to allow of the corns being finely divided in a mill, they were ground as finely as possible in a mill adapted to the purpose. By means of distilled water the finely divided barley was, with quantitative exactness, transferred into a measuring-cylinder — provided with a glass stopper — of 1000 cc. capacity. This cylinder was filled up with distilled water to 1000 cc., and about 5 cc. of toluene were added for the purpose of preventing a development of bacteria. It was then closed and well shaken. The mixture was left to stand at 18—20° for 20 hours exactly, being now and then well shaken. The proteid solution was filtered off quite clear by means of a dry conic filter of a suitable size. This bright filtrate, which, owing to the slight proportion of toluene contained in it, will keep free from bacteria for several days, is at once made use of for the requisite precipitations of proteine substances and for other estimations. In each of these, 50 cc. of barley extract are used.

The estimation of the various soluble proteids was made by the method elaborated by me¹⁾; it constantly proved necessary to work as if the proteine solution contained no mineral matter²⁾. The various estimates of nitrogen were constantly made by Kjeldahl's method, with the use of the iodometric acid titration, starch³⁾ serving as an indicator.

The quantity of soluble acid is estimated by the method

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Ch. **37**, 413 (1898).

²⁾ The conditions in which a proteine solution may be considered to contain no mineral matter, are specified *ibid.* p. 417.

³⁾ Prepared by Syniewski's method. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **30**, 2415 (1897).

elaborated by E. Prior¹), *i. e.* by titration with $\frac{1}{10}$ norm. caustic soda.

Suppose that 50 cc. of the above solution contain:

- (1) a total nitrogen amount $\sim a$ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid,
- (2) a nitrogen content in each of the proteine precipitations $\sim \beta$ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid,
- (3) and a total acidity $\sim \gamma$ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. caustic soda.

Before calculating, from the analytical figures thus found, the values for the above-mentioned unity — 10,000 corns —, it is necessary to make a little re-calculation, for the reason that the barley corn has not the same specific gravity as the means of extraction (water); or, in other words, 1 gr. of dry matter does not occupy a volume of 1 cc. In order to make out the relation between the weight and volume of dry matter of barley, with the calculation here aimed at in view, I weighed out into a 100 cc. measuring flask a definite quantity of dry matter of barley, and added from a burette, little by little — in the course of twenty hours —, some distilled water, until the flask was filled just up to the mark. In this way I found that 9 gr. of dry matter of barley required 94 cc. of water to give 100 cc. of mixture at 20°. In other words, 9 gr. of dry matter at 20° occupy 6 cc. This method cannot, it is true, claim a high degree of accuracy, but, at any rate, it is quite satisfactory in the present case.

Taking into consideration the relation here established between the weight and volume of the dry matter of barley, it will be easy to re-calculate the previously determined analytical numbers in such a way as to make them correspond to the unity 10,000 corns:

$$\frac{a \cdot b}{10} = \text{gr. of dry substance in 10,000 corns} = A.$$

$$\frac{14 \cdot c}{100} = \text{gr. of total nitrogen in 10,000 corns.}$$

$$50 \cdot d = \text{gr. of ash in 10,000 corns.}$$

$$\frac{250000 \cdot b}{A \left(1000 \div \frac{b}{3} \right)} = \text{number of barley corns} \sim 50 \text{ cc. of barley extract} = B.$$

$$\frac{14 \cdot a}{B} = \text{gr. of soluble nitrogen in 10,000 corns.}$$

¹) Bayerisch. Brauerjourn. 1, 469; 2, 362; 4, 74.

$$\frac{14 \cdot \beta}{B} = \text{gr. of soluble nitrogen in 10,000 corns,}$$

precipitable by the precipitant concerned. According to the relations¹⁾ between the different precipitations of proteids, the amounts of nitrogen — gr. in 10,000 corns — representing the various proteine individuals or groups can easily be calculated from these figures.

$\frac{1000 \cdot \gamma}{B}$ = the total amount of acid in 10,000 corns, expressed in cc. of norm. NaOH.

Where the germinating power of the barley has been determined, this was always done on 500 grains by the method most generally used²⁾.

Method II.

In the second and third ripening experiments — years 1903 and 1905 —, as also in all subsequent analyses of barley, the analytical methods described in the foregoing pages were modified in two particulars: —

The corn weight was determined by weighing 2×500 whole corns counted out at random, the weight of 1000 aqueous corns (= a gr.) being determined directly, whilst the soluble nitrogenous matter was dissolved by extracting, by the process described on p. 242, the 1000 corns counted and weighed out with water containing toluene; 1000 finely ground barley corns to 1000 cc. of mixture.

As a consequence of these modifications of the mode of working, the number of barley corns corresponding to 50 cc. of barley extract cannot be calculated by the formula given above — see p. 243 —, but must be determined as follows: —

$$\frac{50000}{1000 \div \frac{A}{15}} = \text{number of barley corns} \sim 50 \text{ cc. of barley extract} = B.$$

The rest of the determinations and calculations required in this mode of working were performed entirely in the manner previously described — see pp. 240—43.

It may be appropriate here to make some remarks on the

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Ch. **37**, 418 (1898).

²⁾ E. Prior: Ch. und Physiol. des Malzes und des Bieres. 1896, p. 60.

above described process by which the soluble proteine substances are extracted from barley.

It must be admitted that at first sight it appears preposterous to assume that the whole of the soluble matter is really dissolved by the mentioned mode of treatment. Nevertheless, provided the materials have been sufficiently ground or crushed, the assumption is sure to hold good, it having constantly to be borne in mind that we are only concerned with the nitrogenous matter and, moreover, only that part of it which is soluble in water, consequently very small quantities of matter. In order to elucidate this point it is necessary to subjoin an account of the experiments having reference thereto. The figures tabulated below, which represent the number of cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid corresponding to the total amount of nitrogen contained in 50 cc. of barley extract, are the results of a series of experiments on the influence of time on the solubility of nitrogenous matter, carried out with various samples of barley and malt.

TABLE II.

Extracted at 18 to 20° in the course of	50 cc. of extract contain nitrogen ∞ cc. $\frac{1}{10}$ norm. acid								
	extracted by means of								
	Water alone		Thymol- water	Toluene water					
				Barley			Malt		
2 hours . . .	—	—	—	—	2·5	2·3	—	6·8	6·5
4 „ . . .	—	—	—	—	2·7	2·6	—	7·2	6·9
20 „ . . .	4·7	6·2	4·1	4·6	3·7	3·6	10·8	8·8	8·4
44 „ . . .	5·2 ¹⁾	8·1 ¹⁾	6·4 ¹⁾	5·0	4·2	4·0	11·4	9·1	8·7
68 „ . . .	6·5 ²⁾	9·0 ²⁾	11·5 ²⁾	5·4	4·5	—	12·0	—	9·1

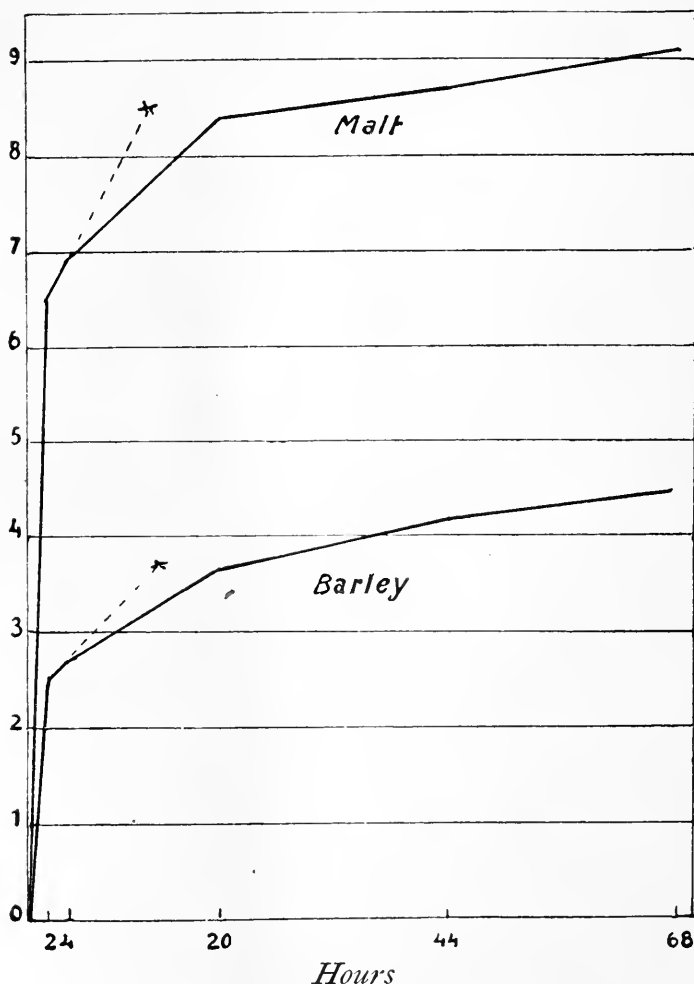
These experiments show, on the one hand, that, of the modes of proceeding here employed, steeping in water containing toluene is the only one which offers sufficient surety in the way of preventing bacteria from developing. But, on the other hand, it will also be seen that twenty hours' treatment with toluene water at 18 to 20° may be considered as satisfactory when the soluble proteids are to be extracted. The circumstance that an increase

¹⁾ The liquid was in a state of incipient putrefaction.

²⁾ The liquid was becoming altogether putrid, showing an increasing growth of bacteria.

of time constantly results in a greater or less augmentation in the amount of the soluble nitrogenous substances, is a necessary consequence of the fact that during the whole course of the operation there occurs a more or less intense enzymatic action. The best way of illustrating the matter will be by plotting out the results of the two completed experiments on a 'system of coordinates, taking the time as abscissa, and cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid, corresponding to the total amount of nitrogen in 50 cc. of extract, as ordinate.

It clearly appears that, whilst the amount of dissolved nitro-



genous matter is steadily increasing, it is not till when we have reached beyond 20 hours' treatment that a fairly proportional ratio between the time and the increase of nitrogen becomes apparent.

This probably means that only after 20 hours' extraction may we reckon that all has been dissolved that is in itself soluble. The pair of curves here given also seem to justify the conclusion that in the time used the enzymatic ac-

tion itself is minimal; the last part of the curves evidently seems to show that the action can at most correspond to an amount of nitrogenous matter equal to 0.02 cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid per hour. Judging by the dotted secondary curves, the perfect extraction must have been completed after from 13 to 20 hours' treatment¹ (see Table and Note on the next page).

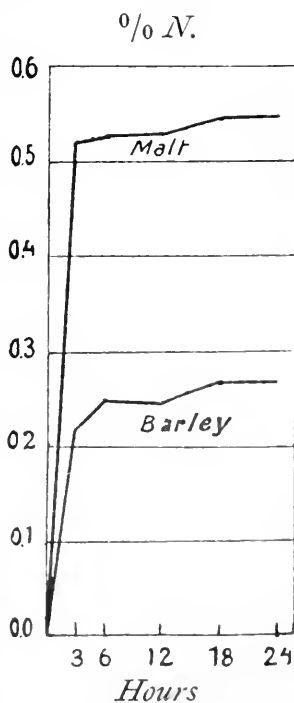
With a view to obtaining a clearer idea of the intensity of the enzymatic action, I prepared a barley extract by the method here described — the toluene water method — and examined the extraction immediately after its preparation and, subsequently, after it had been kept in the dark for seven days at 18°. It was obvious that during this preservation an alteration took place, the extract, which was at the outset altogether bright, becoming turbid. The result of the analysis may be summarized as follows: —

Gr. of nitrogen contained in 10,000 barley corns in the form of	Solution examined	
	at once	after standing for seven days at 18°
Albumin I.....	0·22	0·27
— II.....	0·14	0·07
Denucleïn ²⁾	0·09	0·09
Proteoses or Albumoses.....	0·00	0·02
Peptone	0·09	0·02
Ammonia, Amine-Amid	0·25	0·32
Soluble Nitrogen. Total	0·79	0·79
Acid ∞ cc. of norm. Soda	36·9	33·7

If we take into account that slight errors of analysis will always creep in, however carefully we work, it appears that the amount of enzymatic action here indicated must have been quite minimal. The conversion may be more closely defined as follows: — 0·05 gr. of

¹⁾ An altogether similar mode of procedure is described in the "Transact. of the Guinness Research Laborat." Vol. I. Part I. pp. 61—78 (1903). In this memoir a six hours' treatment is found to be satisfactory, with the difference, it is true, that shaking mashines are used, and that the ratio between dry barley and water is not the same. If the experiments recorded in the Transactions — Table III, p. 68 (barley), and Table V, p. 70 (malt) — are brought together in a similar system of coordinates to my own, it will be seen that there is a fair degree of accordance between our results. The way in which the time of treatment is to be interpreted may, however, admit of doubt.

²⁾ Although this denomination is not satisfactory, it is retained in this memoir, because a better one cannot be given as yet. See p. 281.



nitrogen in the form of albumin II has been — perhaps with fixation of acid — either converted into albumin I or, rather, into an insoluble form, which is then of course precipitated out along with albumin I, whilst another 0.02 gr. of nitrogen in the form of albumin II has by a peptic action been converted into proteoses. The denuclein remains altogether unaffected, whilst 0.07 gr. of nitrogen in the form of peptone has been tryptically converted into amine-amid nitrogen. This result is fully in consonance with general physiological observations. Thus Fr. Weis¹⁾ has found that ungerminated barley contains but extremely minute quantities of enzymes, at all events as far as the active ones are concerned. With regard to the intensity of the peptic and the tryptic fermentative power of ungerminated barley our results are somewhat divergent.

Thus an enzymatic action, though by no means a powerful one, does really take place during the extraction; but for the present we cannot well contrive a plan of operation by which this action could be entirely precluded without some at least of the proteids present being at the same time affected in their solubility. —

I have also in another way tried to form an estimate of the applicability of the method.

Let us imagine that one and the same sample of malt is both extracted by means of toluene water in the manner described above and also mashed in the usual manner by the method of proportionality — the prepared mash mixture being just boiled up before the wort is filtered off —; it is then evident that, owing to the enhanced enzymatic action taking place during the mashing process, the mash extract will contain a greater amount of nitrogen than the toluene water extract. Let us further imagine that the toluene water extract contains the whole of the albuminous matter soluble in water (albumins I and II)²⁾ besides, of course, all the cleavage products of albumin; it is then clear that the increase in the nitrogen content of the mash extract must arise from the circumstance that — owing to the enhanced enzyme action — part of the albuminous substances insoluble in water are split up or transformed into soluble matter, which

¹⁾ Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, 5, 285 (1903).

²⁾ This assumption is favoured by the figures given in Table II.

cannot possibly be either albumin I or albumin II, but must be conversion products arising either from the increased peptase action (denuclein, proteoses, peptone) or from the action of the tryptase (ammonia, amine-amid combinations). But at the same time we must assume that the increased enzyme action also performs a work of demolition with regard to some of the albuminous substances directly soluble in water (albumins I and II). The logical consequence must be that the mash extract will contain a less amount of nitrogen in the form of albumins I and II than the toluene water extract, or at any rate never a greater amount. On the other hand, the quantities of all the other nitrogenous substances must of course be greater in the mash extract than in the toluene water extract. If this train of reasoning can be experimentally confirmed, it would appear that we have here an additional support of the accuracy of the toluene water method. The following table gives the results of a series of experiments made with the object of proving this. The experiments were made on different malt samples, some grown out and others half-way up (slightly germinated); the figures indicating how many gr. of nitrogen of each class correspond to 10,000 malt corns.

TABLE III.

No.	Toluene water extract				Mash extract				Differences			
	Albumin I and II	Denuclein, Proteose, Peptone	Ammonia, Amine- Amid.	Sum of soluble N.	Albumin I and II	Denuclein, Proteose, Peptone	Ammonia, Amine- Amid.	Sum of soluble N.	$\alpha \div a$	$\beta \div b$	$\gamma \div c$	$\delta \div d$
	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ	\div	$+$	$+$	$+$
1	0.54	0.33	0.90	1.77	0.32	0.48	1.25	2.05	0.22	0.15	0.35	0.28
2	0.46	0.35	0.95	1.76	0.36	0.46	1.28	2.10	0.10	0.11	0.33	0.34
3	0.56	0.30	0.98	1.84	0.39	0.48	1.25	2.12	0.17	0.18	0.27	0.28
4	0.49	0.33	0.88	1.70	0.27	0.53	1.27	2.07	0.22	0.20	0.39	0.37
5	0.57	0.29	1.04	1.90	0.45	0.42	1.25	2.12	0.12	0.13	0.21	0.22
6	0.61	0.23	1.06	1.90	0.46	0.41	1.35	2.22	0.15	0.18	0.29	0.32
7	0.64	0.25	1.11	2.00	0.45	0.40	1.34	2.19	0.19	0.15	0.23	0.19
8	0.57	0.27	0.97	1.81	0.35	0.45	1.37	2.17	0.22	0.18	0.40	0.36
9	0.64	0.26	0.81	1.71	0.53	0.35	1.01	1.89	0.11	0.09	0.20	0.18
10	0.81	0.41	0.79	2.01	0.62	0.48	1.64	2.74	0.19	0.07	0.85	0.73
11	0.82	0.40	1.16	2.38	0.62	0.55	1.41	2.58	0.20	0.15	0.25	0.20
12	0.77	0.39	1.13	2.29	0.55	0.58	1.41	2.54	0.22	0.19	0.28	0.25
Mean									0.18	0.15	0.34	0.31

As will be seen, the difference $a \div a$ is in all twelve experiments a negative quantity, or, in other words, we find that the mash extract always contains a less amount of albumins I and II than the toluene water extract. The table further shows that in all the experiments (excepting No. 10) the differences $a \div a$ and $\beta \div b$ are very nearly identical, though with opposite signs, and also that (again with the exception of No. 10) the differences $\delta \div d$ and $\gamma \div c$ are throughout equal. It seems to me that this tends to show that the higher nitrogen-content of the mash extract is attributable to the circumstance that during the mashing process some of the albuminoids insoluble in water are split up down to the amine-amid-combinations¹⁾ ($\gamma \div c = \delta \div d$), whereas the greater proportions of denuclein, proteoses and peptone of the mash extract originate exclusively in the proteolytic cleavage of the albuminoids soluble in water (albumins I and II) — ($a \div a = \beta \div b$). If this is a legitimate conclusion, it really goes to prove the quantitative accuracy of the toluene water method.

3. Experimental Errors.

After having given in the foregoing pages a complete description of the modes of working used, it will be necessary, before we proceed to deal with the experiments themselves, to make some remarks and observations concerning the analytical errors incident to the experiments.

In researches like these it will be particularly important to form an idea of how great an error of experiment we have to take into account in each determination, since errors will otherwise be apt to creep in when we have to interpret the results. For the purpose of guarding against this, a series of experiments was made — altogether by the above methods — with a definite sample of completely stored barley. It is worthy of notice that the sample had been stored for two years and a half in a linen

¹⁾ This implies a rather powerful tryptase action, which may seem to be at variance with M. Krandauer's observations — see *Zeitschr. f. d. ges. Brauw.*, **28**, 449 (1905) —. I may mention, however, that the malt samples employed in my experiments had all of them been kiln-dried at a temperature not exceeding 45°, a circumstance by which this seeming disagreement between Krandauer's observations and my own may be easily accounted for, the more so if we take also in account the results obtained by Fr. Weis: *Compt. rend. des Travaux du Laborat. de Carlsb.* **5**, 277 (1903).

TABLE IV.

Found for the value		b		a	c	d	B	α	β					γ	
Method	No.	The sample contains % of		Weight of 1000 aqueous corns in gr.	N. in 100 corns 2 cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid	Gr. of ash in 200 corns	Number of corns in 50 cc. of extract	50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid	as precipitable by					Acid in 50 cc. of extract 2 cc. of $\frac{1}{10}$ norm. NaOH	
		Water	Dry substance						Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₃ ÷	Ur Ac ₂ ÷	Mg SO ₄		
I	1	12.23	87.77	43.06	40.1	0.1998	59.8	4.1	1.4	2.5	2.5	2.5	2.7	2.1	2.4
	2	12.52	87.48	43.10	42.5	0.1976	59.8	4.4	1.3	2.5	2.5	2.5	2.8	2.0	2.3
	3	12.57	87.43	40.79	37.9	0.2050	63.1	4.0	1.4	2.4	2.4	2.4	2.7	2.0	2.4
	4	12.72	87.28	41.66	38.1	0.2118	61.8	4.0	1.2	2.5	2.5	2.5	2.7	2.0	2.1
	Greatest difference	0.49		2.31	4.6	0.0142	3.3	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3
II	1	12.23	87.77	43.24	40.1	0.1998	51.3	3.3	1.1	2.1	2.1	2.1	2.3	1.7	2.0
	2	12.52	87.48	43.25	42.5	0.1976	51.3	3.5	1.2	2.1	2.1	2.1	2.4	1.7	2.1
	3	12.57	87.43	42.98	37.9	0.2050	51.3	3.4	1.1	2.1	2.1	2.1	2.3	1.7	2.0
	4	12.72	87.28	43.12	38.1	0.2118	51.3	3.3	1.1	2.1	2.1	2.1	2.3	1.7	1.9
	Greatest difference	0.49		0.27	4.6	0.0142	0	0.2	0.1	0	0	0.1	0.1	0	0

From these analytical numbers the various values with regard to the unity 10,000 corns are calculated in the manner described on p. p. 243—244. We thus arrive at the numbers stated in the following Table V.

TABLE V.

Method	No.	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain -- gr. of nitrogen in the form of										10,000 corns contains		Sum of	
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Amino- nia, Amine- Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid cc. n. Na OH	Albumin I and II	Denuclein, Proteose, Peptone	
			I	II												
I	1	377.9	0.33	0.16	0.10	0	0.04	0.33	0.96	4.65	5.61	9.99	40.1	0.49	0.14	
	2	377.0	0.30	0.17	0.12	0	0.07	0.37	1.03	4.92	5.95	9.88	38.5	0.47	0.19	
	3	356.6	0.31	0.13	0.09	0	0.07	0.29	0.89	4.42	5.31	10.25	38.0	0.44	0.16	
	4	363.6	0.27	0.18	0.12	0	0.04	0.30	0.91	4.42	5.33	10.59	34.0	0.45	0.16	
	Greatest difference	21.3	0.06	0.05	0.03	0	0.03	0.08	0.14	0.50	0.64	0.71	6.1	0.05	0.05	
II	1	379.5	0.30	0.16	0.11	0	0.06	0.27	0.90	4.71	5.61	9.99	39.0	0.46	0.17	
	2	378.4	0.33	0.13	0.11	0	0.08	0.31	0.96	4.99	5.95	9.88	40.9	0.46	0.19	
	3	375.8	0.30	0.16	0.11	0	0.06	0.30	0.93	4.38	5.31	10.25	39.0	0.46	0.17	
	4	376.4	0.30	0.16	0.11	0	0.06	0.27	0.90	4.43	5.33	10.59	37.0	0.46	0.17	
	Greatest difference	3.7	0.03	0.03	0	0	0.02	0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0	0.02	

This table contains the materials requisite for re-calculating the results for the unity 1000 gr. of dry substance. I have made such a re-calculation and brought together the resulting numbers in Table VI.

TABLE VI.

Method	No.	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry substance contain		Sum of		
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein, Proteose, Peptone
			I	II											
I	1	377.9	0.87	0.42	0.26	0	0.11	0.88	2.54	12.31	14.85	26.44	106.1	1.29	0.37
	2	377.0	0.80	0.45	0.32	0	0.19	0.97	2.73	13.05	15.78	26.21	102.1	1.25	0.51
	3	356.6	0.87	0.36	0.25	0	0.20	0.82	2.50	12.39	14.89	28.74	106.6	1.23	0.45
	4	363.6	0.74	0.50	0.33	0	0.11	0.82	2.50	12.15	14.65	29.13	93.5	1.24	0.44
	Greatest difference	21.3	0.13	0.14	0.08	0	0.09	0.15	0.23	0.90	1.13	2.92	13.1	0.03	0.14
II	1	379.5	0.79	0.42	0.29	0	0.16	0.71	2.37	12.41	14.78	26.33	102.8	1.21	0.45
	2	378.4	0.87	0.34	0.29	0	0.21	0.83	2.54	13.18	15.72	26.11	108.1	1.21	0.50
	3	375.8	0.80	0.43	0.29	0	0.16	0.79	2.47	11.66	14.13	27.28	103.8	1.23	0.45
	4	376.4	0.80	0.43	0.29	0	0.16	0.71	2.39	11.77	14.16	28.13	98.3	1.23	0.45
	Greatest difference	3.7	0.08	0.09	0	0	0.05	0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.02	0.05

bag in a dry locality in the laboratory and, hence, might be regarded as having been brought into a state of absolute equilibrium as regards the composition of the dry substance. The sample was cleaned in the same manner as those set apart for the principal experiments.

With this sample two series of experiments were set on foot, namely one series exactly by method I and another by method II, six to ten days intervening between each experiment.

I attach considerable importance to these determinations of sources of error and, therefore, have thought proper to give all the analytical numbers as directly determined. By means of these, my readers are enabled to judge of the value of these determinations.

The foregoing three tables contain all the details of these experiments. Table IV (p. 251) gives the analytical values as directly determined. The results calculated for the unity 10,000 corns are recorded in Table V (p. 252), and Table VI (p. 253) summarizes the results calculated for the unity 1000 gr. of dry matter of barley.

Method I — see p. 240—244 — is the one employed for the first barley ripening experiment, and Method II — see p. 244 — that used in the second and third principal experiments.

On looking at the “greatest differences” stated in the preceding tables, it will be noticed that they vary somewhat with the different proteids. I therefore believe I am justified in supposing that each proteid estimation is equally subject to error, and it appears to be most natural to take the greatest of the “greatest differences” as the ultimate analytical error in each proteid estimation. This is how I arrive at the ultimate “errors of analysis” collected in the following table, which will be taken into account later, when we come to the interpretation of the experiments.

It is obvious that Method II is more reliable than Method I, for the plain reason that the corn weight is determined by the former with a much higher degree of accuracy than by the latter.

A particularly striking feature is the great error which we are obliged to make allowance for in regard to the estimation of total nitrogen, even though, as is done in all these analyses, this estimation is made throughout on 100 corns (about 3 to 4 gr. of dry substance of barley). This, however, is nothing new.

TABLE VII.

Method	Result calculated for the unity	Analytical errors									
		Gr. of dry substance in 10,000 corns	Each of determinations: Album. I, II, Denuclein, Proteose and Peptone	Sum of Ammonia, Amine-Amid	Nitrogen as soluble combinations	Nitrogen as insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Sum of Album. I and II	Denuclein, Proteose and Peptone
I	10,000 corns	21.3	0.06	0.08	0.14	0.50	0.64	0.71	6.1	0.06	0.06
	1000 gr. dry sub- stance	do.	0.14	0.15	0.23	0.90	1.13	2.92	13.1	0.14	0.14
II	10,000 corns	3.7	0.03	0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03	0.03
	1000 gr. dry sub- stance	do.	0.09	0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09	0.09

C. Bleisch and P. Regensburg¹⁾ have clearly shown how cautious we must be in regard to our ideas as to the degree of precision with which the total nitrogen content of barley crops can be determined.

This difficulty leads me to put this question: — How can it still be maintained that the total nitrogen content of dry barley may afford a standard in the valuation of malting barley, at any rate within so narrow limits as those proposed by Haase?

4. Principal Experiments.

Barley Ripening Experiment I — (1901).

By the obliging kindness of Professor T. Westermann a lot of ground in the experimental field of the Copenhagen College of Agriculture was left me for use in the cultivation of the barley sample. The lot had a superficial content of about 70 square metres; it was of common manuring cultivation and was subjected to the usual preliminary treatments. In order to have

¹⁾ Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **27**, 729 (1904).

TABLE VIII.

Date when the sample was taken and examined (1901)	Found for the value Stage of maturity or Time of storage	a	b	c	d	A	B	β						γ
		Weight in gr. of 1000 aqueous corns	The sample contains % of dry substance	N. in 100 corns, 2 cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid.	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry sub- stance in 10,000 corns	50 cc. of solu- tion 2 number of corns	50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid						Acid in 50 cc. of extract 2 cc. of $\frac{1}{10}$ n. Na OH
								as total N.	as precipitable by					
								Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₃ ÷	Ur Ac ₂ ÷	Mg SO ₄		
July 24	Green-ripeness	62.20	35.44	30.4	0.1403	220.4	40.7	5.3	1.0	1.6	1.6	1.7	1.3	1.8
" 30	Late green-ripeness	72.76	46.00	37.6	0.2074	334.7	34.9	4.0	1.4	2.1	2.0	2.2	1.8	1.7
August 5	Yellow-ripeness	75.17	56.81	48.0	0.2504	427.0	33.9	3.4	1.5	2.1	2.2	2.4	2.0	1.2
" 8	Late yellow-ripeness	75.90	58.75	56.0	0.2507	445.9	33.6	3.7	1.8	2.3	2.4	2.6	2.1	1.1
" 13	Full maturity	61.43	72.97	60.0	0.2638	448.2	41.7	4.8	2.3	2.9	2.9	3.2	2.5	2.4
" 19	Over-ripeness	48.22	82.12	53.0	0.2283	396.0	53.3	5.7	2.1	3.5	3.5	4.0	3.1	2.7
September 2	Over-ripeness { 14 sample stored { 44 for — days { 64	44.25	88.60	55.6	0.2144	392.1	58.2	5.7	1.5	3.6	3.6	4.0	3.1	2.3
October 2		45.35	88.25	52.5	0.2067	400.2	56.8	6.2	1.6	3.7	3.8	4.5	3.3	2.4
" 22		42.63	88.41	58.0	0.2050	376.9	60.4	5.8	1.7	3.4	3.6	4.2	3.2	3.0

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table IX.

TABLE IX.

(Ripening Experiment I — 1901).

Date when the sample was taken and examined (1901)	Stage of maturity or Time of storage	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of										10,000 corns contain		Sum of	
			Albumin		Dennuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Ni- trogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Dennuclein, Proteose and Peptone	
			I	II												
July 24	Green-ripeness	220.4	0.34	0.11	0.10	0	0.03	1.24	1.82	2.44	4.26	7.0	44.2	0.45	0.13	
" 30	Late green-ripeness	334.7	0.56	0.16	0.12	0	0.04	0.72	1.60	3.66	5.26	10.4	48.7	0.72	0.16	
August 5	Yellow-ripeness	427.0	0.62	0.17	0.08	0.04	0.08	0.41	1.40	5.32	6.72	12.5	35.4	0.79	0.20	
" 8	Late yellow-ripeness	445.9	0.75	0.09	0.12	0.04	0.08	0.46	1.54	6.30	7.84	12.5	32.7	0.84	0.24	
" 13	Full maturity	448.2	0.77	0.07	0.13	0	0.10	0.54	1.61	6.79	8.40	13.2	57.6	0.84	0.23	
" 19	Over-ripeness	396.0	0.55	0.26	0.11	0	0.13	0.45	1.50	5.92	7.42	11.4	50.7	0.81	0.24	
September 2	Over-ripeness { sample stored { for — days {	392.1	0.36	0.39	0.12	0	0.09	0.41	1.37	6.41	7.78	10.7	39.5	0.75	0.21	
October 2		400.2	0.39	0.39	0.13	0.03	0.17	0.42	1.53	5.82	7.35	10.3	42.3	0.78	0.33	
" 22		376.9	0.39	0.31	0.09	0.04	0.14	0.37	1.34	6.78	8.12	10.3	49.7	0.70	0.27	
Analytical errors		21.3	0.06							0.08	0.14	0.50	0.71	6.1	0.06	

the various stages of maturation determined in a satisfactory manner, I applied to Mr. A. Christensen, assistant to the Royal Veterinary and Agricultural College at Copenhagen, who was kind enough to charge himself with this part of the task. The experimental plot was, in the early part of May 1901, sown with two-rowed Prentice barley of the Lyngby type. The weather was damp and cold until about the 22nd of June; but from this date till the 23rd of July it was, on the contrary, very warm and dry. During the remaining part of the time that the experiment lasted, the weather was generally dry and warm. On account of these conditions the period of development — reckoned from green-ripeness to full maturity — was of very short duration, *viz.* from the 24th of July to the 13th of August, or twenty days.

The barley thus grown was examined in six different stages of ripeness. The details are given in Table IX. Storage experiments were made only with the last sample — over-ripeness — and extended over 14, 44 and 64 days' storage.

Table VIII (p. 256) contains all the numbers determined by direct analysis. The method used was the one referred to as Method I (see p. p. 240—43).

Barley Ripening Experiment II — (1903).

The cultivation of this sample was made in a lot of the experimental field of the Agricultural College entirely similar to that used for the first ripening experiment. The lot was about the middle of May 1903 likewise sown with two-rowed Prentice barley of the Lyngby type. Towards the end of June the weather was generally cool, with many wet days, followed by a warm and dry period, which lasted till about the 24th of July. From this date till the end of the experiment the weather was rather cool with abundant rain-fall, in consequence of which the period of growth and maturation extended over a greater length of time — *viz.* from the 27th of July till the 28th of August, or thirty-two days — than it did in experiment I.

This experiment, like the preceding one, comprised six different stages of ripeness, about which further details will be given in Table XI. Storage experiments were instituted with the last three maturation samples, which were examined after from 28 to 59 days' storage. In this experiment the analytical determinations were performed according to Method II (see p. 244).

Table X embodies the numbers arrived at in the analyses of the maturation samples, and Table XII those found in the analyses of the storage samples.

TABLE X.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Found for the value	a	b	c	d	A	B	a	β						γ
									50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid						
									as total N.	Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	FeAc ₃ ÷	UrAc ₂ ÷	Mg SO ₄	
	Stage of maturity	Weight in gr. of 1000 aqueous of corns	The sample con- tains — % of dry substance	N. in 100 corns ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry sub- stance in 10,000 corns	50 cc. of solu- tion of corns ∞ cc. of corns								Acid 1.50 cc. of extract ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. Na OH
July 27	Early green-ripeness	55.94	30.93	23.0	0.1225	173.0	50.6	5.1	1.1	1.5	1.6	1.8	1.1		0.9
August 3	Late green-ripeness	74.61	36.65	34.4	0.1765	273.5	50.9	6.8	2.4	2.9	3.2	3.4	2.9		1.1
" 10	Early yellow-ripeness	87.53	43.11	49.2	0.2260	377.3	51.3	8.1	2.8	4.1	4.1	4.4	3.7		1.4
" 17	Yellow-ripeness	89.56	50.99	59.3	0.2435	456.7	51.6	7.2	3.1	4.4	4.4	4.8	3.9		1.8
" 28	Full maturity	83.02	59.96	74.0	0.2455	497.8	51.8	7.1	3.1	4.2	4.2	4.7	3.8		1.85
September 7	Over-ripeness	71.76	67.30	75.5	0.2566	483.0	51.7	6.6	2.0	3.6	3.6	4.2	3.2		2.0

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table XI.

(Ripening Experiment II — 1903).

TABLE XI.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Stage of maturity	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of								10,000 corn contains		Sum of			
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. NaOH	Albumins I og II	Denuclein, Proteose and Peptone	
I	II	0.03												0.04		0.06
July 27	Early green-ripeness	173.0	0.34	0	0.10	0.02	0.06	0.91	1.41	1.81	3.22	6.13	17.8	0.34	0.18	
August 3	Late green-ripeness	273.5	0.66	0.06	0.08	0.08	0.06	0.93	1.87	2.95	4.82	8.83	21.6	0.72	0.22	
" 10	Early yellow-ripeness	377.3	0.76	0.25	0.11	0	0.08	1.01	2.21	4.68	6.89	11.30	27.3	1.01	0.19	
" 17	Yellow-ripeness	456.7	0.84	0.22	0.13	0	0.11	0.65	1.95	6.35	8.30	12.18	34.9	1.06	0.24	
" 28	Full maturity	497.8	0.84	0.19	0.11	0	0.13	0.65	1.92	8.44	10.36	12.28	35.7	1.03	0.24	
September 7	Over-ripeness	483.0	0.54	0.33	0.11	0	0.16	0.65	1.79	8.78	10.57	12.83	38.7	0.87	0.27	
Analytical errors		3.7	0.03						0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03	

TABLE XII.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Found for the value		a	b	c	d	A	B	α	β					γ
	Stage of matur- ity	Stored for —days								50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of 1/10 norm. acid					
		Weight in gr. of 1000 aqueous corns	The sample con- tains — % of dry substance	N. in 100 corns ∞ cc. of 1/10 norm. acid.	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry substance in 10,000 corns	50 cc. of solu- tion number of corns	N.	as total	as precipitable by			Acid in 50 cc. of extract ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH		
										Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₃ ÷ Ur Ac ₃ ÷	Mg SO ₄		
August 17	Yellow- ripeness	0	89.56	50.99	59.3	0.2435	456.7	51.6	7.2	3.1	4.4	4.4	4.8	3.9	1.8
September 14		28	54.45	83.86	60.8	0.2552	456.6	51.6	5.5	1.8	3.7	3.7	4.0	3.2	1.6
October 12		56	54.03	84.35	60.4	0.2570	455.7	51.6	5.6	1.9	3.7	3.7	4.0	3.3	1.65
August 28	Full maturity	0	83.02	59.96	74.0	0.2455	497.8	51.8	7.1	3.1	4.2	4.2	4.7	3.8	1.85
September 25		28	57.30	84.94	76.6	0.2530	486.7	51.7	7.1	3.0	4.4	4.3	4.8	3.8	1.90
October 26		59	56.87	85.97	80.0	0.2500	490.7	51.7	7.0	2.3	4.4	4.3	4.8	3.9	2.0
September 7	Over- ripeness	0	71.76	67.30	75.5	0.2566	483.0	51.7	6.6	2.0	3.6	3.6	4.2	3.2	2.0
October 5		28	58.46	83.47	78.7	0.2613	488.0	51.7	7.2	2.2	4.4	4.5	5.2	4.1	2.1
November 2		56	57.00	84.71	79.1	0.2610	482.9	51.7	7.6	2.9	4.4	4.4	5.1	4.0	2.15

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table XIII.

(Storage experiment 1903).

TABLE XIII.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Stage of maturity	Stored for — days	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of										10,000 corns contain		Sum of		%		
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. NaOH	Albumins I og II	Denuclein, Proteose and Peptone	Vegetative energy	Vegetative capacity		
			I	II															
August 17	Yellow-ripeness	0	456.7	0.84	0.22	0.13	0	0.11	0.65	1.95	6.35	8.30	12.18	34.9	1.06	0.24	—	—	
September 14		28	456.6	0.49	0.38	0.13	0	0.09	0.40	1.49	7.02	8.51	12.76	31.0	0.87	0.22	5.8	22.2	
October 12		56	455.7	0.52	0.38	0.10	0	0.09	0.43	1.52	6.94	8.46	12.85	32.0	0.90	0.19	63.6	75.8	
August 28	Full maturity	0	497.8	0.84	0.19	0.11	0	0.13	0.65	1.92	8.44	10.36	12.28	35.7	1.03	0.24	—	—	
September 25		28	486.7	0.81	0.22	0.16	0	0.11	0.62	1.92	8.80	10.72	12.65	36.8	1.03	0.27	5.6	12.4	
October 26		59	490.7	0.62	0.44	0.13	0	0.11	0.60	1.90	9.30	11.20	12.50	38.7	1.06	0.24	95.6	99.6	
September 7	Over-ripeness	0	483.0	0.54	0.33	0.11	0	0.16	0.65	1.79	8.78	10.57	12.83	38.7	0.87	0.27	—	—	
October 5		28	488.0	0.60	0.48	0.11	0.03	0.19	0.54	1.95	9.07	11.02	13.07	40.6	1.08	0.33	23.6	38.2	
November 2		56	482.9	0.79	0.29	0.11	0	0.19	0.68	2.06	9.01	11.07	13.05	41.6	1.06	0.32	93.6	99.4	
Analytical errors			3.7	0.03						0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03			

Barley Ripening Experiment III — (1905).

The materials for this experiment were cultivated in my garden at Glostrup, near Copenhagen, on a lot of ground 7 square metres in extent. This was a piece of common arable land rich in mould and having a clayey subsoil. The year before it had been taken into cultivation for gardening purposes, and in the autumn it was dug and dunged with horse-manure in the usual manner. In April 1905 the lot was again dug and several times thoroughly raked.

On the 4th of May it was sown with a perfectly pure sample of Primus barley from Svalöf — Pedigree improvement —, which had been very kindly sent me by "Sveriges Utsädesförening i Svalöf" (the Swedish Seed-corn Association at Svalöf). The sample, which proceeded from the harvest of 1904 and had been brought under cultivation at the experiment station at Svalöf, had been botanically examined and tested by Dr. H. Tedin, and is entered in the annual report of the above association with No. 0706 in the book of genealogy. Thus there was every safety that the seed sown for this experiment was a perfectly pure stock, and one well defined botanically. In this particular the present experiment differs from the two foregoing, which were made with stocks the purity of which, from a botanical point of view, was less certain.

As regards the weather, it was cold in the month of May; but in June it was warm and dry and very windy, remaining essentially so until the time when the first sample was taken, the 17th of July. From this date till the end of the experiment the weather was warm and of middle humidity. On account of these seasonal conditions the growth and maturation period was of nearly the normal duration, namely from July 17 to August 14, or twenty-eight days.

The experiment comprised four stages of ripeness, for details on which I refer to Table XV. Storage experiments were made with the last three maturity samples, which were examined after from thirty to sixty-three days' storage.

In this experiment the analytical experiments were made by method II (see p. 244).

In Table XIV the analytical numbers for the ripening samples are set forth, and in Table XVI those of the storage samples.

TABLE XIV.

Date when the sample was taken and examined (1905)	Found for the value Stage of maturity	a	b	c	d	A	B	β						γ
		Weight in gr. of 1000 aqueous corns	The sample contains % of dry substance	N. in 100 corns ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry substance in 10,000 corns	50 cc. of solution ∞ number of corns	50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ acid						Acid in 50 cc. of extract ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. Na OH
								as precipitable by						
								total N.	Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₃ ÷	Ur Ac ₂ ÷	Mg SO ₄	
July 17	Early green-ripeness	62.17	30.11	30.9	0.1310	187.2	50.6	7.5	1.7	2.4	2.5	2.7	1.9	1.0
August 3	Yellow ripeness	92.20	51.34	79.6	0.2468	473.4	51.6	7.8	3.5	4.7	4.7	5.1	4.2	1.9
" 14	Full maturity	69.90	66.78	81.8	0.2540	466.8	51.6	5.9	2.2	3.3	3.3	3.6	2.8	2.0
" 24	Over-ripeness	58.04	70.59	74.3	0.2247	409.7	51.4	6.0	2.2	3.4	3.4	3.8	2.9	2.1

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following results: —

(Ripening Experiment III — 1905).

TABLE XV.

Date when the sample was taken and examined (1905)	Stage of maturity	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of							10,000 corns contain		Sum of			
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein, Proteose and Peptone
			I	II											
July 17	Early green-ripeness	187.2	0.47	0.03	0.16	0.03	0.06	1.33	2.08	2.25	4.33	6.55	19.8	0.50	0.25
August 3	Yellow-ripeness	473.4	0.95	0.19	0.14	0	0.10	0.74	2.12	9.02	11.14	12.34	36.8	1.14	0.24
" 14	Full maturity	466.8	0.60	0.16	0.14	0	0.08	0.62	1.60	9.85	11.45	12.70	38.8	0.76	0.22
" 24	Over-ripeness	409.7	0.60	0.19	0.14	0	0.11	0.59	1.63	8.77	10.40	11.24	40.9	0.79	0.25
Analytical errors			0.03			0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03			

TABLE XVI.

Date when the sample was examined (1905)	Found for the value		a	b	c	d	A	B	α	β					γ															
	Stage of maturity	Stored for — days								Weight in gr. of 1000 aqueous of corns	The sample contains % of dry substance	N. in 100 corns cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry substance in 10,000 corns		50 cc. of solu- tion of corns N. ∞	50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid													
																	as total	as precipitable by												
																		Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₃ ÷	Ur Ac ₃ ÷	Mg SO ₄								
August 3 September 4 October 2	Yellow- ripeness	0 32 60	92.20 55.90 55.45	51.34 82.47 82.81	79.6 77.9 79.3	0.2468 0.2454 0.2457	473.4 461.0 459.2	51.6 51.6 51.6	7.8 7.4 7.1	3.5 2.8 2.9	4.7 4.3 4.0	4.7 4.3 4.0	5.1 5.2 4.9	4.2 4.2 4.0	Acid in 50 cc. of extract cc. of $\frac{1}{10}$ norm. NaOH 2															
August 14 Septemb. 13 October 16																Full maturity	0 30 63	69.90 53.77 53.64	66.78 86.34 86.63	81.8 78.4 79.3	0.2540 0.2495 0.2483	466.8 464.3 464.7	51.6 51.6 51.6	5.9 6.4 6.0	2.2 2.3 1.9	3.3 3.9 3.8	3.3 3.8 3.8	3.6 4.4 4.1	2.8 3.6 3.3	2.0 2.4 2.2
August 24 Septemb. 27 October 23																														

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table XVII.

(Storage experiment 1905).

TABLE XVII.

Date when the sample was examined (1905)	Stage of maturity	Stored for — days	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of									10,000 corns contain		Sum of			
				Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & Na OH	Albumins I and II	Denuclein, Proteose and Peptone		
I	II	0.03															0.04	0.06
August 3	Yellow-ripeness	0	473.4	0.95	0.19	0.14	0	0.10	0.74	2.12	9.02	11.14	12.34	36.8	1.14	0.24		
September 4		32	461.0	0.76	0.38	0.03	0	0.24	0.60	2.01	8.90	10.91	12.27	48.4	1.14	0.27		
October 2		60	459.2	0.79	0.30	0.00	0	0.24	0.60	1.93	9.17	11.10	12.29	48.4	1.09	0.24		
August 14	Full maturity	0	466.8	0.60	0.16	0.14	0	0.08	0.62	1.60	9.85	11.45	12.70	38.8	0.76	0.22		
Septemb. 13		30	464.3	0.62	0.36	0.08	0	0.13	0.55	1.74	9.24	10.98	12.48	46.5	0.98	0.21		
October 16		63	464.7	0.52	0.38	0.13	0	0.08	0.52	1.63	9.47	11.10	12.42	42.6	0.90	0.21		
August 24	Over-ripeness	0	409.7	0.60	0.19	0.14	0	0.11	0.59	1.63	8.77	10.40	11.24	40.9	0.79	0.25		
Septemb. 27		34	402.9	0.54	0.36	0.11	0	0.11	0.54	1.66	8.95	10.61	11.43	40.9	0.90	0.22		
October 23		60	406.1	0.52	0.41	0.08	0	0.13	0.58	1.72	8.46	10.18	11.34	40.9	0.93	0.21		
Analytical errors			3.7	0.03							0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03	

5. Interpretation of the Barley Ripening Experiments.

Before we proceed to consider the results deducible from the figures embodied in the preceding tables, it must be clear before us that the designations "green-ripeness", "yellow-ripeness", etc., are by no means to be looked upon as absolute values. In fact, the characterization given on p. 238 of the different stages of ripeness must not be regarded as scientifically established, but merely as a purely practical — but also practically legitimate — description. It is no easy matter to gather a conveniently large sample of barley which has arrived at a definite and indisputable degree of maturity. In this respect I feel justified in stating that I have tried to determine with the greatest possible amount of practical accuracy the degree of ripeness at which the samples had arrived, and I dare say my results go to show that my object has been attained. The main point is that we should have before us a progressive series of developmental stages ranging almost from the formation of the barley corn (green-ripeness or early green-ripeness) till it has acquired full maturity. The stage of over-ripeness simply means that the corn has remained in connection with the mother-plant beyond the full ripeness stage. The stage which offers the highest degree of surety as regards a correct judgment is doubtless the stage of full maturity; yet even here slight errors (one or two days) cannot always be precluded, especially when the period of development is very long.

On considering the duration of the developmental periods in the three experiments — reckoning, as before, from green-ripeness or early green-ripeness —, it will be seen that the duration was 20 days in the first, 32 days in the second, and 28 days in the third experiment. We shall therefore be justified in stating that the 1st experiment (1901) had a short, the 2nd (1903) a long, and the 3rd experiment an approximately normal period of development, which was, however, in the last case rather a little too long than too short. In this view of the matter, the duration of the developmental period will be a consequence of the atmospheric conditions obtaining during the particular experiment, provided the date of sowing be as near as possible the same. A short period of development corresponds

to a warm and dry summer, whilst a long period is a result of a wet and cold summer.

Further I must emphasize that the materials employed for the experiments I and II had been grown in one and the same place (the experiment field of the Agricultural College) and proceed from one and the same sort of barley (Prentice barley), whereas the material for experiment III had been grown in a garden at Glostrup and, accordingly, perhaps under somewhat different conditions of soil, besides being developed from Primus barley grown at the experiment station at Svalöf.

Finally, it is also to be observed that I have thought proper to keep development and storage distinct in judging the results, since it will be an easy matter later on to connect these two factors, which are in reality so widely different.

a. Growth and Ripening of Barley.

By way of bringing together in a connected form the numerical results of these experiments, I have plotted them out on two series of curves — see Curve Tables I and II —, where the abscissa lines represent the number of days which have elapsed after the stage of green-ripeness or early green-ripeness, whilst the ordinates represent the values found for the respective combinations or groups of combinations, the unity adopted being 10,000 corns in Table I (excepting the case of dry substance and acidity) and 100 corns in Table II.

For the purpose of forming, to begin with, an idea of the reliability of the continuity in the three maturation experiments, it will be instructive to glance at the four curves “Dry Substance”, “Ash”, “Total Nitrogen” and “Insoluble Nitrogen” — Table I. It is conspicuous that, within each experiment, these four curves show as close a congruity among themselves as regards their rising and falling off as may reasonably be expected. The apparent deviations in this respect may be said to be so slight that they may be safely referred to analytical errors¹⁾. We shall therefore be justified in considering this accordance as a proof

¹⁾ The magnitude of analytical errors is stated throughout at the bottom of each table.

that the experimental materials are sufficiently reliable to serve as a basis for the following considerations.

In further considering the four curves referred to above — Dry Substance, Mineral Constituents, Total and Insoluble Nitrogens —, it is to be observed at once that the Dry Substance Curve in Table I has been drawn with only $\frac{1}{100}$ of the value for which the other three curves have been put down; hence, of course, Curve Table I can only help us to form a rough estimate. With all four curves, however, it is at once conspicuous that the growth of the barley is particularly strong during that period which extends to the stage of yellow-ripeness. The corn has then very nearly attained its full weight; at any rate, it may be said to have reached its maximum volume. The growth continues, but in a much less degree, from yellow-ripeness to full maturity, at which latter stage the grain has generally attained its greatest dry substance weight; then the growth ceases entirely. If the corn remains attached to the mother-plant beyond the stage of full maturity, a falling off becomes observable not only in the amount of dry substance, but also in that of mineral constituents, total and insoluble nitrogen. Here the objection may be made that mineral constituents, total and insoluble nitrogen in experiment II show a rise from full maturity to over-ripeness, and that dry substance in experiment III is falling off already between yellow-ripeness and full maturity. But when we make due allowance for the value of experimental errors, this objection falls to the ground, and it becomes evident that the above statement holds good. In fact, a reference to Tables XI and XV will show that, in the case of experiment II, the rises occurring from full maturity to over-ripeness are constantly lower than the respective experimental errors, *viz.* for mineral constituents 0.55 and 0.71 respectively, in the case of total nitrogen 0.21 and 0.64, in that of insoluble nitrogen 0.34 and 0.61, whilst the falling off in dry substance from yellow-ripeness to full maturity in experiment III amounts to 6.6 gr., as compared with an experimental error of 3.7 gr.

For the sake of rendering still more apparent the relations between these four curves, I have brought them together in Curve Table II, indicating their mutual relations. In order not to make the table disproportionally large, I have left out that portion of the curves which represents from 0.7 to 3.5 gr. of

substance in 100 corns. The table will be easily intelligible by means of the particulars given in it.

This curve table gives a far more distinct picture of the growth and ripening conditions of barley than Table I, the more so as, besides stating the real values directly found, I have imagined a prolongation of each curve beyond the initial and concluding experiments, these prolongations being of course represented by straight (dotted) lines. This furnishes a picture of the state of things obtaining before and after the experimental periods, although a picture which must be handled very cautiously, especially as regards the after period.

Let us first consider the antecedent periods, as represented by the dotted curve pieces relating to the period preceding the stage of green-ripeness. It will be seen that all four curves meet very near the same point of the abscissa axis; and a further comparison between the three experiments shows that the point of the abscissa line where they converge is (in all three experiments) almost at an equal distance from the green-ripeness stage (point O). This approximate accordance appears to warrant the conclusion that the way in which the barley corn develops, from its coming into existence till the stage of green-ripeness, is not affected to any essential degree by the soil or by changes in the weather, and it also seems to be the same in different varieties of barley. Now since the characteristics of each particular variety were implanted in the very germ of the corn sown, the considerations here given seem to indicate that the variety of barley cannot *per se* be absolutely conclusive for the dry matter composition of the crops. We shall revert to this question later on.

Now if we glance at the after periods — the dotted curve pieces produced beyond the over-ripeness stage —, we at once come across a great difference between the experiments I and II. In experiment I these curves soon fall on the abscissa axis, whereas in experiment II it is only after a very long time that they reach down to it. Now it is evident that our experimental facts do not possibly admit of being interpreted on the assumption that in experiment I the dry substance of the barley corn has been used up altogether when the corn has been allowed to over-ripen on the mother-plant for 93 days, and so forth; certainly such an interpretation will not do at all. On the other

hand, it appears that the following proposition is borne out by facts: Barleys which have had a growth and ripening period of short duration are much more liable to suffer a loss of dry substance by over-ripening than such barleys as have had a long developmental period. It is obvious that variations in the weather have much to do with the question, since the experiments I and II were made with one and the same sort of barley, which had been grown in one and the same plot of land, the only variations being in the atmospheric conditions (1901 and 1903).

Here again we have before us one of those numerous instances of the marvellous way in which nature knows how to adapt everything in the best manner.

The interpretation here suggested is borne out by the facts revealed by experiment III. This experiment was made on Primus barley from Svalöf, which had been grown in a garden at Glostrup under atmospheric conditions approximately normal, yet approaching somewhat nearer to the conditions of experiment II than to those of experiment I. If we compare all three experiments — Curve Table II —, it will be seen that experiment III is intermediate between experiments I and II. It is therefore not likely that the greater or less liability of barley to lose dry substance by over-ripening can be traced to the quality of the particular variety of barley or to the condition of the soil; on the contrary, in the case of all three experiments it is doubtless changes in the atmospheric conditions that are the cause of this difference.

Even from an exclusively quantitative point of view we may perhaps derive some information from Curve Table II. On comparing the dry substance curves of experiments I and II, it appears that the same variety of barley yields a bigger grain in a long than it does in a short period of growth. Experiment III is not conclusive in this connection, since it was made on quite a different variety of barley; nevertheless we see that even in this direction experiment III holds the mean between I and II. Thus, here again it would appear that it is not the variety of barley¹⁾ which is absolutely deci-

¹⁾ In order not to be misunderstood, it is to be observed that *Hordeum distichum* and *H. tetrastichum* (syn. *H. hexastichum*) are throughout regarded as species, *H. d. erectum* and *H. d. nutans* as varieties.

cive¹⁾), but that the weather²⁾), and possibly also conditions of soil etc., exert a far greater influence.

If, from a quantitative point of view, we compare the dry substance curves with the ash curves in all three experiments, it becomes apparent that there is something of an indication that there exists an inversely proportional ratio between them. That is to say, a particularly large-grained barley (having a high dry matter content in each corn) has a lower content of mineral matter (as gr. pr. corn) than a small-grained barley. The divergences are, however, as will easily be seen, so small that I can only advance this as a mere guess. According to G. André³⁾), the strong increase in mineral matter which occurs at the early stages of the growth — this author made his experiments on lupines, Spanish beans and maize — tends to show that these constituents play some part in the conversion of soluble into insoluble carbohydrates. As far as barley is concerned, it appears that this view is not supported by the results of my own experiments⁴⁾. It is true that, also in the case of barley, the percentage of ash in dry matter — see p. 287, Table XXI — is highest at the beginning of the development of the grain; but, to my mind, the interpretation of this fact is to be looked for elsewhere. In all organized beings, whether animal or vegetable, the organic material is built up with an inorganic skeleton for its support. But it is no less certain that the inorganic skeleton must form the groundwork, as it were, of the entire organic structure; or, in other words, the building up of any animals or vegetable organ must be supposed, in the abstract, to begin with an inorganic skeleton, round which organic matter accumulates little by little. This hypothesis makes it easy to understand why the dry matter of the barley corn — and probably any other vegetable organ — is richer in mineral

¹⁾ As to differences of species, on the contrary, it is a well known fact that they give rise to differences in this respect.

²⁾ Manifestly the factor by which the duration of the period of growth is affected more than by any other.

³⁾ *Compt. rend. d. l'Acad. des sciences* **134**, 995 (1902); **138**, 1510 and 1712 (1904); **139**, 805 (1904); **140**, 1417 (1905).

⁴⁾ If this interpretation were correct, we should certainly expect the ash content during the whole course of development to be directly proportional to the amount of dry matter.

constituents at the commencement of the growth than it is in later stages

It will further be observed that the curves of total nitrogen and insoluble nitrogen go together, or nearly so. Just as André says that the ripening of a seed may be characterized by the progressive transformation of soluble into insoluble carbohydrates, so the conversion of soluble into insoluble proteids might with as good reason be said to characterize the progressive ripening. In both cases, however, it must be borne in mind that the assertions only hold good until the grain has reached the stage of full maturity. In that of over-ripening there is, as we have seen, a marked falling-off in the amount of these substances, as also in that of dry matter, and, consequently, this characterization does not hold good here, it being quite unquestionable that over-maturity is to be regarded as an objectionable form of storage, so that it does not properly come under the category "maturation". The waste of matter which occurs during over-ripening has a striking analogy to an incipient germination, and in so far I believe it quite correct to define the notion of ripening in the way proposed by André, only with this difference that we have at the same time in view the transformation of soluble into insoluble proteine. Thus it may be said that full maturity has been reached when the conversion of soluble into insoluble carbohydrates and soluble into insoluble proteids has ceased or reached its maximum.

In any view of the matter, it must be maintained that the development and ripening properly so called have been completed immediately after the barley grain has reached the stage of full maturity; consequently, any further modification occurring in it cannot be attributable to a continued growth, but is more probably due to an internal transformation of the material stored up in the grain. If the latter remains attached to the mother-plant after having acquired full maturity, there occurs a waste of dry matter, in other words, respiration prevails over assimilation.

It is to be observed here that, just as the over-ripening barley corn suffers a loss both of total nitrogen and dry matter, so the same is true with regard to the wheat-grain¹), although

¹ Nowacki, *loc. cit.*, p. 53. From the last table given here the number of gr.

with the difference that in this latter case the waste of dry matter seems to be of minor importance. Thus it would appear that this peculiarity is of fairly general occurrence.

I will also draw attention to the very close analogy existing between the curve of mineral constituents and that of total nitrogen during the ripening processes of barley. Yet I do not mean to assert that there exists any definite relation of cause and effect between them. But it seems to me rather probable that the cause why the soluble proteines, and, more especially, albumins I and II, are not totally converted into insoluble ones, must be looked for in the very presence of mineral substances; it may, however, be rather the quality than the quantity of these which is decisive.

As regards the numbers of acidity, I may be brief. They simply represent the total acidity of the acid combinations soluble in water, expressed in cc. of normal NaOH for 10,000 barley corns. In Curve Table I this curve is drawn up with only $\frac{1}{20}$ of the value stated above. It will be noticed that, while experiments II and III exhibit full concordance during the development, experiment I is on the contrary very divergent. At first I thought that in experiment I some error might have been made; but I have not been able to find any. To repeat the experiment was impracticable. At all events it seems to be certain that, on the one hand, the amount of the acid combinations soluble in water is on the increase during the whole course of development of the barley corn, and that, on the other, considerable fluctuations may occur, especially during developmental periods of short duration. On the basis of the material under consideration it is impossible to prove the existence of any genetic relation between the acidity curve and one or more of the other curves. It may be that, just as is the case with mineral substances, more thorough investigations into this part of the question are necessary; in the case of acids these investigations should perhaps be of a similar kind to those

of dry matter in 100 wheat-grains can be easily calculated. We arrive at the following numbers:

	Milchreife-a	Gelbreife	Todreife
gr. of dry matter in 100 corns . . .	2.9645	4.2869	4.2325

It is true that these figures indicate but a very little waste of dry matter, but nevertheless they tend to prove the correctness of the above view.

made by E. Charabot and A. Hébert¹⁾ on various vegetable organs.

We now proceed to inquire into the question as to the behaviour of water-soluble nitrogenous substances during the development of the barley corn. It may be natural first to consider the numbers and curves (Curve Table I) expressing the total amount of "soluble nitrogen". In experiment I (short period of development) the curve is falling continually down to the stage of yellow-ripeness; then it rises a very little until full maturity, and at last it shows a slight falling-off during over-maturity. Making proper allowance for analytical errors in this experiment, the amount of soluble nitrogen may, however, be said to remain constant in the individual corn from yellow-ripeness to over-ripeness. On the contrary, a glance at experiment II (long period of development) will show that the curve of soluble nitrogen is continually rising from early green-ripeness to early yellow-ripeness, after which stage it falls till that of over-maturity is reached. In confronting this result with the fact, established in an earlier part of this memoir, that the ripening may be characterized by the progressive transformation of soluble into insoluble proteine, it appears that, in the case of a short development period, the period of growth ranging from "green-ripeness to yellow-ripeness" partakes as much, or even more, of the nature of a maturation than of a real development, whereas the case is entirely the reverse when we have to do with a long period of development.

As regards experiment III (normal period of development), it furnishes further corroboration of the fact established above, that this experiment is in a certain measure intermediate between experiments I and II, though a little nearer to II than to I. If now we bear in mind that, as a matter of course, the plant must take in the nitrogen it requires in the form of soluble combinations, it is evident that the results arrived at go to prove that, when the development of the barley corn (from green-ripeness to yellow-ripeness) takes place during a normal period of development, there exists an absolute equilibrium between the quantity of nitrogen received in a given time and the nitrogen quantity converted in the same time into insoluble combina-

¹⁾ Compt. rend. d. l'Acad. des sciences **138**, 1714 (1904).

tions (soluble nitrogen having a rectilinear curve); whereas the transformation of soluble nitrogen combinations into insoluble ones in a short period of development goes on at a quicker rate than does the intake of nitrogen, the reverse being the case in a long developmental period. Thus we have here a very definite evidence of the significance of the weather in regard to the transformation of nitrogenous substances during the growth of the barley corn. If we assume two distinct phases of the development of the barley corn, the above statements may also be expressed as follows: — During a short period of development the ripening process has got the upper hand of the developmental process as early as the stage of green-ripening, whereas in a long period the ripening process does not prevail over the developmental process till a little before yellow-ripeness. During a normal period of development, on the contrary, there is an absolute equilibrium between the developmental and ripening processes from the stage of green-ripeness to that of yellow-ripeness (or, more exactly, to a little before yellow-ripeness).

We have so far only been dealing with the quantitative side within each experiment. It will, however, also be of some interest to consider the quantitative relation between the experiments. Here, however, it is evident that experiment III does not admit of being compared with I and II, since that experiment differs from the two latter both in regard to sort of barley and conditions of soil, factors which are likely to exert a marked influence in the direction here considered. In the following table (see p. 277) I have therefore confined myself to bringing together the quantitative numbers for soluble and total nitrogens as resulting from experiments I and II.

This table shows that the amount of soluble nitrogenous combinations in a barley grain, in any stage following green-ripeness, is larger in a grain which has had a long than in one that has had a short period of development. This fact cannot be simply attributable to the greater intake of nitrogen taking place during the long period of development; this seems to be evident from the annexed differential numbers, the interpretation of which is obvious from the table.

TABLE XVIII.

Stage of maturity	Soluble nitrogen in ripening experiment		Total nitrogen in ripening experiment		Differences	
	I	II	I	II	Soluble N.	Total N.
					II ÷ I	II ÷ I
Early green-ripeness	—	1·41	—	3·22	—	—
Green-ripeness	1·82	—	4·26	—	—	—
Late green-ripeness	1·60	1·87	5·26	4·82	+ 0·27	÷ 0·44
Early yellow-ripeness	—	2·21	—	6·89	—	—
Yellow-ripeness	1·40	1·95	6·72	8·30	+ 0·55	+ 1·58
Late yellow-ripeness	1·54	—	7·84	—	—	—
Full maturity	1·61	1·92	8·40	10·36	+ 0·31	+ 1·96
Over-ripeness	1·50	1·79	7·42	10·57	+ 0·29	+ 3·15
Analytical errors	0·14	0·06	0·64	0·64		

Whilst the difference between total nitrogen in a barley grain of a long and one of a short period of development is steadily increasing till the stage of over-maturity is reached, the difference of soluble nitrogen — taken in the same point of view — increases at first until yellow-ripeness, from which stage it decreases till that of over-maturity is reached. These facts manifestly prove that the weather exerts a sensible influence on the quantitative occurrence and transformations of nitrogenous substances during the ripening process of barley.

We now proceed to a consideration of the six components into which "soluble nitrogen" has been divided by the analytical methods used. More especially, we want to ascertain, first, the way in which the condensation of amine amid combinations into soluble proteids is effected in the course of the development of the barley corn, and, in the second place, the influence which the weather may exert on this process.

A glance at the curves of ammonia, amine, amid nitrogen (A. Curve Table I) will show that they may all three, with good reason, be said to reach their minima at the stage of yellow-ripeness, and thereafter to remain unaltered up to over-maturity. On the other hand, that part of the curves which represents the period prior to yellow-ripeness is seen to exhibit marked differences in the three experiments. Certain it is, however, that at some point or other of the course of development the amount

of amine amide, as well as also all the other amounts of substances expressed by curves, must have been = 0; in other words, all the curves must have their starting-points somewhere in the abscissa line. Hence it manifestly follows that — in all three experiments — the amine amid curves have reached their maxima before yellow-ripeness, but that the distance between maximum and yellow-ripeness is variable. On comparing only the experiments I and II with each other, we arrive at this further conclusion that this maximum is in the vicinity of the stage of yellow-ripeness when the barley grain has a long period of development, and that, according as the period shortens, the maximum becomes more and more distant from that stage of development. As to experiment III, it cannot be ascertained whether it admits of being interpreted in the same manner, because we lack determinations relating to the phases lying between early green-ripeness and yellow ripeness, that is, that part of the development within which the maximum for this experiment must be sought. However, the general aspect of the curve relating to experiment III tends to show that the above statements apply to this experiment also.

The upshot of these considerations is manifestly that the condensation of the amine amid combinations into soluble proteids takes place with greater intensity during a short than during a long period of development, and that this process is very nearly in an equilibrium with the further intake of nitrogen as soon as yellow-ripeness is reached.

The existence of such an equilibrium may not be quite evident from the curves, the only immediate conclusion deducible from these being that, in any period of development the amount of amid nitrogen in a barley grain remains constant from yellow-ripeness to over-maturity. However, the matter will be readily cleared up if the amount of amid nitrogen is re-calculated in such a manner as to express the percentage of total nitrogen. I have made such a re-calculation, the results of which are set forth in the following table (see p. 279).

The analytical error incidental to this mode of calculating the results can be easily found by means of the numbers stated in Table V, Method II, p. 252. A simple calculation will show that the error corresponds to 0.8.

TABLE XIX.

Stage of maturity	Percentage of total nitrogen in the form of aminonia, amine, amid nitrogen. In ripening experiment		
	I	II	III
Early green-ripeness	—	28·3	30·7
Green-ripeness	29·1	—	—
Late green-ripeness	13·7	19·3	—
Early yellow-ripeness	—	14·7	—
Yellow-ripeness	6·1	7·8	6·6
Late yellow-ripeness	5·9	—	—
Full maturity	6·4	6·3	5·4
Over-ripeness	6·1	6·2	5·7

If we take this error into account, it will appear from the numbers given in Table XIX that the equilibrium mentioned above does occur at the stage of yellow-ripeness.

As regards the quantitative relation between the three experiments, I do not believe any positive result can be deduced from them. It is true that a slight difference is observable — nearly in the same direction as mentioned in regard to “soluble nitrogen” —, but the divergences are so insignificant as not to warrant any safe conclusion.

An inspection of the curves representing Albumin I (I, Curve Table I) will show at once, in the case of all three experiments, that the amount of this proteid is increasing until about the stage of yellow-ripeness, after which it decreases up to over-maturity. The rate at which this decrease takes place is somewhat different in each experiment; but the difference is comparatively so slight that it may be accounted for by analytical errors.

With regard to the curves for Albumin II (II, Curve Table I), all three experiments give perfectly analogous results. The amount of albumin II in a barley corn increases — in a greater or less degree — till about yellow-ripeness; then it decreases a little or, rather, remains unaltered from yellow-ripeness till full maturity, and, finally, it increases again — in a greater or less degree — from full maturity to over-maturity. — No climatic influence can be shown to assert itself in the case of either of these two proteids.

Before leaving the discussion of these two curves, I would draw attention to the fact that when the barley corn has arrived at its full development (yellow-ripeness), the subsequent portions of the curves (albumins I and II) apparently exhibit an inverse ratio to each other, or, in other words: When albumin I decreases, albumin II increases, and *vice-versa*. This, however, must by no means be interpreted as a proof that albumin I can be converted into albumin II, because the fact referred to may just as well be due to quite different transformations. That such do take place, is apparent from the sum of the albumins I and II (Tables IX, XI and XV), which would necessarily be a constant quantity if we had to do with a pure and simple conversion of albumin I into albumin II. The experiments here described do not enable us to get at the bottom of this question.

It still remains to examine the results relating to the three proteine individuals denuclein, proteose and peptone. The numeric quantities concerned are not given in Curve Table I, because the deviations occurring from one developmental stage to the next are so slight as to fall in most cases within the limits of analytical errors.

As regards the appearance of proteoses in the three experiments (Tables IX, XI and XV), the tables show that these generally do not exist in the barley grain at all, either during its growth or ripening; at most, we find mere traces of them. It seems to me that this fact lends some countenance to the assumption that the condensation of amine amid combinations into proteine individuals of a higher order does not take place with the proteoses as intermediate terms, but that the proteoses are exclusively to be regarded as hydrolytic cleavage products of already existing proteine individuals of a higher order. Here, indeed, we meet with the most striking contrast between construction and demolition (or formation and transformation) of nitrogenous substances of a proteine character. In this connection it is also to be observed that we may no doubt come across barley crops containing a more or less considerable amount of proteoses, but, on closer inspection, it becomes apparent that this is only the case when the barley after reaping has been exposed to the action of a somewhat unpropitious weather, or, in other words, when the barley has begun to germinate before

the harvest. Accordingly, a noticeable amount of proteose in a barley crop must always be considered as indicative of rather unfavorable harvest conditions.

In regard to the appearance of real peptones during the development of the barley grain, all three experiments go to show that this proteid increases in quantity both during the growth and during the ripening of the grain. The peptones themselves occur only in very small quantities in the barley grain, the increase taking place from one developmental stage to the next being also insignificant; still, for all that, an increase does evidently take place. It seems to me that this latter fact gives some countenance to the hypothesis that in the condensation of amine amid combinations into proteine individuals of a higher order the real peptones act as intermediate terms. This hypothesis is supported by the circumstance that the process on which the condensation of the amine-amid-combinations depends cannot possibly be of an unvarying intensity during the whole course of development of the barley grain, but must necessarily decrease as the grain acquires a greater and greater density or maturity.

The amount of denucleïn remains unaltered during the whole course of the growth and ripening process of the barley corn, from green-ripeness to over-maturity. Hence, the figures do not throw any light at all on the question as to whether or not denucleïn is an intermediate term in the formation of albumins. With regard to the appearance of this group of organic nitrogenous substances in the barley grain, we shall not be able to gain an insight into it until the chemical nature of this particular substance has been better cleared up. It may be observed here that denucleïn is precipitated by mercuric chloride from a neutral liquid, as also by ferric acetate and uranium acetate, whereas it cannot be salted out by magnesium sulphate from an acid liquid. Thus, denucleïn cannot be assumed to be a real albumin or a proteose; neither, being precipitable by ferric acetate, can it be considered as a real peptone. The name denucleïn was given by me to this substance on the assumption that it was some cleavage product of a nucleo-albumin. I have set on foot investigations which, I hope, will enable me later on to throw some light on this peculiar nitrogenous substance.

b. Storage of Barley.

As regards the changes which go on in the barley corn during storage, an inspection of the last four series of numbers in Table IX and all the series in Tables XIII and XVII will show that the numbers exhibit so small fluctuations within each group of substances that their interpretation would not be facilitated by plotting them out on a system of coordinates. The fluctuations or changes indicated by the above three tables deviate, in general, only very little from the analytical error found.

If we are to gain a clear insight into the way and direction in which the quantity of each group of substances alter during

TABLE XX.

Survey of the Transformations going on during Storage (two months).

Group of substances	Exper. I (1901)	Experiment II (1903)			Experiment III (1905)		
	Over- ripeness	Yellow- ripeness	Full- ripeness	Over- ripeness	Yellow- ripeness	Full- ripeness	Over- ripeness
Gr. of dry substance in 10,000							
corns	o	o	? (÷)	? (o)	÷	o	? (o)
Albumin I	÷	÷	÷	+	÷	÷	÷
Albumin II.	+	+	+	? (÷)	+	+	+
Denuclein	o	o	o (+)	o	÷	? (o)	o (÷)
Proteose	o	o	o	o	o	o	o
Peptone	? (o)	o	o	o	+	? (o)	o
Ammonia, Amine, Amid. .	o (÷)	÷	o (÷)	? (o)	÷	÷	o
Soluble nitrogenous combinations	? (÷)	÷	o	+	÷	? (o)	+
Insoluble nitrogenous combinations	? (+)	o (+)	o (+)	o	o	o	o
Total Nitrogen	? (+)	o	o	o	o	o	o
Mineral constituents	o (÷)	o	o	o	o	o	o
Acid	?	o	o	o	+	+	o

Explanation of the signs: —

- o = No change, allowance being made for the analytical error.
 ÷ = Absolute decrease, " "
 + = Absolute increase, " "
 ? = Numbers fluctuating.
 o (÷) = Doubtful decrease, " "
 o (+) = Doubtful increase, " "
 ? (÷) = Numbers fluctuating, though rather decreasing.
 ? (+) = Numbers fluctuating, " " increasing.
 ? (o) = Numbers fluctuating, " " constant.
- } In all these cases the divergences are so small as hardly to be of any consequence.

the storage of barley, this can best be realized, I believe, by an examination of Table XX. In this table I have tried, by means of simple signs, to give a general view of the changes which are going on in each group of substances during storage, the duration of which extends to two months. The material is arranged with regard to the stage of maturity within each experiment. The meaning of the signs used is explained below. If my readers wish to follow the changes quantitatively, this can most easily be done by constantly referring to Tables IX, XIII and XVII.

The barley grain cannot, as a rule, be said to suffer a loss of dry matter during storage. An exception is formed by the yellow-ripeness sample of experiment III, which indicates a waste of dry matter — during a two months' storage — corresponding to 14.2 gr., as against an analytical error of 3.7 gr. In all the other cases the departures are so small as to be of no consequence. Hence, a respiration loss is not likely to occur during the storage of barley, provided the latter takes place under suitable conditions — not in damp air, and with no access of light —, and providing also the barley sample has reached a suitable degree of maturity before being reaped.

In considering the results arrived at with regard to mineral constituents, total nitrogen and insoluble nitrogen, we meet with some slight divergences, it is true, but these are so minimal that they do not signify. Exactly the same is true with regard to the proteid groups denuclein, proteose and pepton, the yellow-ripeness sample of experiment III being excepted. In this sample the denuclein entirely disappears during the storage, whilst the amount of peptone is increasing in proportion. It does not appear whether this peculiar and, as it would seem, rather exceptional fact is conditioned by the particular sort of barley, or perhaps attributable to the circumstance that the yellow-ripeness sample in experiment III may have been reaped a little earlier than in experiment II. The most remarkable feature in the case is, however, that we are here in presence of an instance in which we have cogent reasons for assuming, that denuclein is converted, even quantitatively, into peptone.

On consideration of the substance groups ammonia,

amine-amid, and soluble nitrogen, it will be noticed that these behave identically in the main. In the yellow-ripeness samples both of them decrease during storage; in the full maturity samples they remain constant or still exhibit a slight tendency to decrease a little, whereas in the over-maturity samples they remain unaltered or show a disposition to increase a little. Thus, at this stage a reaction, though only a slight one, becomes apparent, which must of necessity be attributable to the difference of ripeness. I would here refer to the statement made on p. 273 with regard to the definition of "over-ripening" or "over-modification". The definition given there seems to me to be corroborated in a measure by the results arrived at here, since these evidently show that in the stage of yellow-ripeness the equilibrium in regard to the progressive transformation of the nitrogenous substances in the barley grain does not yet occur, whilst in the full maturity stage the equilibrium is apparent; on the contrary, when the stage of over-maturity is reached, the equilibrium is again broken off, or rather broken down (in the opposite direction).

On examining the albumins I and II, it at once becomes conspicuous that, in any stage of ripeness, these two proteids form a contrast to each other during storage¹). As far as can be seen, albumin I decreases during storage, whereas albumin II increases. Only in the case of the over-maturity sample of experiment II — long period of development — we meet with the exact reverse.

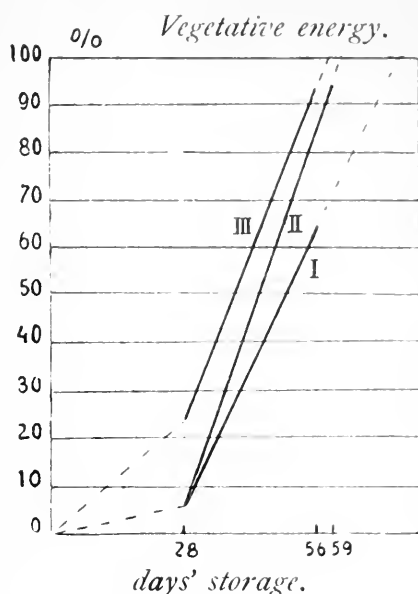
As regards the numbers of acidity, no definite conclusion can be drawn from the results, any more than in the case of the development samples.

The conclusion at which we have arrived seem to show that the ripening barley grain is tending toward a state of equilibrium in regard to its nitrogenous constituents, and that when, on the harvesting or, more exactly, the reaping of the barley, this equilibrium has been attained, it is not disturbed or broken off during storage, except in the case of albumins I and II.

The figures embodied in Table XIII and expressing the

¹) This fact decidedly points in the same direction, and is in full concordance with the result I arrived at in regard to their mutual relation — see p. 280.

vegetative energy and capacity, tend to show that in my full-maturity samples we have to do with normally and full grown barley corns; but, at the same time, it becomes manifest that the germinative power is not affected by an over-ripening, except in so far as in the over-maturity sample the maximum may be reached after a storage of shorter duration than in the full maturity sample. On the other hand, the yellow-ripeness sample requires a considerable longer storage to attain its full power of germination.



This is best illustrated by the accompanying curve-table, in which I means the yellow-ripeness sample, II the full maturity and III the over-maturity sample. All three curves have been produced both up- and downwards — with dotted lines — in order to furnish a clearer picture. Any further explanation will be superfluous.

6. The Barley Ripening and Storage Experiments viewed from a practical standpoint.

In considering the above described changes going on in a barley corn during its growth, ripening and storage, it is to be observed that they are not particularly fit for giving a picture of the quality of the barley crops. In order to obtain this from the experiments made, it will be necessary to re-calculate our results with barley dry matter as a unity. We shall thus get a collection of numbers which industrials may find directly applicable and perhaps be able to turn to account. The Tables IX, XI, XIII, XV and XVII, contain all the data requisite for such a re-calculation. In Tables XXI and XXIII the whole of the experimental material is set forth, calculated with regard to the unity 1000 gr. of dry matter.

It is a matter of course that this mode of calculating the results must give a somewhat different picture and to a certain extent exhibit another displacement in respect to the quantity of each particular group of substances from one stage of develop-

ment to the next. Some of the interpretations advanced above will, of course, be confirmed by the new figures; but these will more particularly throw considerable light on the relation of each group of substances to barley dry matter.

Table XXI sets forth the experimental results obtained in regard to the development and maturation of barley, as calculated as — gr. of substance in 1000 gr. of dry matter.

On examining in this table the numbers relating to each ripening experiment, it will be noticed that those representing mineral constituents, acid, total nitrogen, soluble and insoluble nitrogen, and ammonia-amine-amid nitrogen, exhibit considerable fluctuations from one developmental stage to the next, although not to the same extent in all the experiments (owing perhaps to the influence of the weather). Hence it appears that in the case of these groups of substances there does not exist any constant relation with regard to dry matter.

In the case of the proteids properly so called we also, it is true, fall in with some fluctuations from stage to stage, but these are generally so small as to be all but covered by the corresponding analytical errors. Certain it is, nevertheless, that the quantities of albumins I and II and denuclein do not show constant values in the dry matter during the development.

On a closer inspection of the numbers given in Table XXI, it will be found, however, that the greatest fluctuations within each group of substances occur in the early stages, those prior to yellow-ripeness. On the contrary, from yellow-ripeness to over-maturity, that is, during the maturation properly so called, we generally meet only small fluctuations. In order to render this more apparent, I have brought together in Table XXII all the numbers relating to the yellow-ripeness and over-maturity samples, with the addition of the differences between these two series of numbers.

These differential numbers are illustrative of the modification which the chemical composition of dry matter is apt to undergo when barley is harvested at different stages lying between yellow-ripeness and over-maturity. The direction taken by the modification appears from the table and is indicated by the signs. We find that the amount of albumin I decreases in a greater or less degree as the corn is allowed to

TABLE XXII.

Ripening experi- ment No. and Year	Stage of maturity	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of									1000 g. of dry sub- stance contain	
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc n. Na OH
			I	II									
I (1901)	Yellow-ripeness	427.0 396.0	1.45 1.39	0.40 0.66	0.19 0.28	0.09 0	0.19 0.33	0.96 1.13	3.28 3.79	12.46 14.95	15.74 18.74	29.2 28.8	82.9 128.0
	<i>Difference</i>	÷ 31.0	÷ 0.06	+ 0.26	+ 0.09	÷ 0.09	+ 0.14	+ 0.17	+ 0.51	+ 2.49	+ 3.00	÷ 0.4	+ 45.1
II (1903)	Yellow-ripeness	456.7 483.0	1.84 1.12	0.48 0.68	0.28 0.23	0 0	0.24 0.33	1.43 1.35	4.27 3.71	13.90 18.17	18.17 21.88	26.7 26.6	76.4 80.1
	<i>Difference</i>	+ 26.3	÷ 0.72	+ 0.20	÷ 0.05	0	+ 0.09	÷ 0.08	÷ 0.56	+ 4.27	+ 3.71	÷ 0.1	+ 3.7
III (1905)	Yellow-ripeness	473.4 409.7	2.01 1.46	0.40 0.46	0.30 0.34	0 0	0.21 0.27	1.56 1.45	4.48 3.98	19.05 21.40	23.53 25.38	26.1 27.4	77.7 99.8
	<i>Difference</i>	÷ 63.7	÷ 0.55	+ 0.06	+ 0.04	0	+ 0.06	÷ 0.11	÷ 0.50	+ 2.35	+ 1.85	+ 1.3	+ 22.1
Analytical errors { I in experiment II and III			21.3 3.7	0.14 0.09				0.15 0.12	0.23 0.17	0.90 1.52	1.13 1.59	2.92 2.02	13.1 9.8

attain a greater and greater degree of maturity, whereas the quantities of albumin II, insoluble nitrogen, total nitrogen¹⁾ and the water-soluble acid combinations increase in a greater or less degree. The amount of water-soluble nitrogenous combinations is also subject to considerable fluctuations, which, however, are sometimes positive, sometimes negative, probably owing to the influence of the weather. In the case of denucleïn, proteose, peptone, ammonia, amine-amid and ash, the fluctuations are so small that they must without doubt be considered as analytical errors. Consequently, as far as these latter groups of substances are concerned, the results manifestly prove that, in each individual barley sample, they have a constant weight in the dry matter, as soon as the corn has reached its full development, so that they remain constant during the real ripening process.

All three experiments show that, when the barley crop is reaped at an early stage of its growth — between yellow-ripeness and full maturity —, it will be less rich in nitrogen than will be the case when it is reaped later, between full maturity and over-maturity. Thus, with regard to barley my experiments have given a result which is in perfect accord with those obtained by Nowacki²⁾ in the case of wheat.

Now if we ask, what changes take place with regard to the composition of dry matter during the storage of barley, it is necessary to look at Table XXIII. On looking over the numbers contained in this self-explanatory table, we find that, as a general rule, the changes undergone by the dry matter during storage depart but very little from the analytical errors found.

The following table (XXIV) gives a summary view of the informations which can be derived from the numbers referred to. The changes taking place during storage are expressed by signs, in exactly the same manner as in Table XX, p. 282.

On comparing this table (see p. 291) with Table XX, p. 282, it will at once be noticed that there is a perfect concordance

¹⁾ W. Johannsen: Compt. rend. des Travaux du Laborat. de Carlsberg 4, 122 (1899).

²⁾ *loc. cit.*

Experiment No. and Year	Stage of matur- ity	Stored for —days	Gr. of dry sub- stance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — g. of nitrogen in the form of										1000 gr. of dry substance contain		Sum of	
				Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein, Proteose and Peptone	
				I	II												
I (1901)	Over- ripeness	0 14 44 64	396.0 392.1 400.2 376.9	1.39 0.92 0.97 1.03	0.66 0.99 0.97 0.82	0.28 0.31 0.32 0.24	0 0 0.07 0.11	0.33 0.23 0.42 0.37	1.13 1.04 1.07 0.98	3.79 3.49 3.82 3.55	14.95 16.35 14.55 17.99	18.74 19.84 18.37 21.54	28.8 27.3 25.7 27.3	128.0 100.7 105.7 131.9	2.05 1.91 1.94 1.85	0.61 0.54 0.81 0.72	
	Yellow- ripeness	0 28 56	456.7 456.6 455.7	1.84 1.07 1.14	0.48 0.83 0.83	0.28 0.28 0.22	0 0 0	0.24 0.20 0.20	1.43 0.88 0.95	4.27 3.26 3.34	13.90 15.38 15.22	18.17 18.64 18.56	26.7 27.9 28.2	76.4 67.9 70.2	2.32 1.90 1.97	0.52 0.48 0.42	
	Full maturity	0 28 59	497.8 486.7 490.7	1.69 1.66 1.26	0.38 0.45 0.90	0.22 0.33 0.26	0 0 0	0.26 0.23 0.22	1.31 1.27 1.23	3.86 3.94 3.87	16.95 18.09 18.95	20.81 22.03 22.82	24.7 26.0 25.5	71.7 75.6 78.9	2.07 2.11 2.16	0.48 0.56 0.48	
II (1903)	Over- ripeness	0 28 56	483.0 488.0 482.9	1.12 1.23 1.64	0.68 0.98 0.60	0.23 0.23 0.23	0 0.06 0	0.33 0.39 0.39	1.35 1.11 1.41	3.71 4.00 4.27	18.17 18.58 18.65	21.88 22.53 22.92	26.6 26.8 27.0	80.1 83.2 86.1	1.80 2.21 2.24	0.56 0.68 0.62	
	Yellow- ripeness	0 32 60	473.4 461.0 459.2	2.01 1.65 1.72	0.40 0.82 0.65	0.30 0.07 0	0 0 0	0.21 0.52 0.52	1.56 1.30 1.31	4.48 4.36 4.20	19.05 19.31 19.97	23.53 23.67 24.17	26.1 26.6 26.8	77.7 104.9 105.4	2.41 2.47 2.37	0.51 0.59 0.52	
	Full maturity	0 30 63	466.8 464.3 464.7	1.29 1.34 1.12	0.34 0.78 0.82	0.30 0.17 0.28	0 0 0	0.17 0.28 0.17	1.33 1.18 1.12	3.43 3.75 3.51	21.10 19.90 20.38	24.53 23.65 23.89	27.2 26.9 26.7	83.1 100.2 91.7	1.63 2.12 1.94	0.47 0.45 0.45	
III (1905)	Over- ripeness	0 34 60	409.7 402.9 406.1	1.46 1.34 1.28	0.46 0.89 1.01	0.34 0.27 0.20	0 0 0	0.27 0.27 0.32	1.45 1.35 1.43	3.98 4.12 4.24	21.40 22.21 20.83	25.38 26.33 25.07	27.4 28.4 27.9	99.8 101.5 100.7	1.92 2.23 2.29	0.61 0.54 0.52	
	Analytical ex- periments in exper. I, II and III		21.3 3.7	0.14 0.09					0.15 0.12	0.23 0.17	0.90 1.52	1.13 1.59	2.92 2.02	13.1 9.8	0.14 0.09		

TABLE XXIV.

Survey of the Transformations taking place during storage (two months).

Group of substances	Exper. I (1901)	Experiment II (1903)			Experiment III (1905)		
	Over- ripeness	Yellow- ripeness	Full- ripeness	Over- ripeness	Yellow- ripeness	Full- ripeness	Over- ripeness
Gr. of dry substance in 10,000							
corns	o	o	? (\div)	? (o)	\div	o	? (o)
Albumin I	\div	\div	\div	+	\div	\div	\div
— II	+	+	+	? (\div)	? (+)	+	+
Denuclein	? (o)	o	o (+)	o	\div	? (o)	\div
Proteose	o	o	o	o	o	o	o
Peptone	? (o)	o	o	o	+	? (o)	o
Ammonia, Amine-Amid . .	o	\div	o	? (+)	\div	\div	o
Soluble nitrogenous combin.	? (\div)	\div	o	+	\div	? (o)	+
Insoluble nitrogenous „	+	o	o (+)	o	o	o	o
Total Nitrogen	+	o	o (+)	o	o	o	o
Mineral constituents	o	o	o	o	o	o	o
Acid	+	o	o	o	+	+	o

The signification of the signs is explained on p. 282 (Table XX).

between them, so that the present table must be interpreted in exactly the same manner as Table XX.

Here I need only call attention to the fact that the concordance found to exist between the two tables is a conclusive proof that no waste of dry matter takes place during the storage of barley, providing the barley is stored under favourable conditions.

7. Researches on the Chemical Composition of the Dry Matter of Barley as dependent on Differences of Species, Variety and Type.

In the foregoing pages we have pointed out the influence which the degree of maturity and the duration of storage may exert on the chemical composition of the dry matter of barley. We now proceed to inquire into the question as to its dependence on differences of species, variety and type.

At first I attempted to solve this problem by examining different sorts of barley as met with in commerce. The materials

thus gathered were, however, of such a nature that it proved to be quite impossible to form a notion of the influence which might be exerted on the composition of the dry matter by differences of species, variety and type. This failure was a natural consequence of the circumstance that a lot of barley as obtainable in the market is really a mixture of different varieties, which have been cultivated under dissimilar conditions of soil and manuring and harvested at different stages of maturation, besides having perhaps been stored differently and not during the same length of time.

For the purpose of procuring suitable experimental materials, I applied — by the advice of Professor T. Westermann — to the scientific director of the Swedish Seed-corn Association (Sveriges Utsädesförening) at Svalöf, Professor Hjalmar Nilsson. Mr. Nilsson, interesting himself warmly for the matter, was ready to furnish me with the requisite materials, and with great obligingness undertook to make a convenient selection among the pure species, varieties and types at his disposal.

Since the Swedish Seed-corn Association at Svalöf has adopted the Pedigree system — one corresponding exactly to the ingenious single-cell system devised by E. C. Hansen with regard to lower organisms —, the materials sent me from Svalöf were altogether reliable in regard to purity of species, variety and type. Also in reference to uniformity in the conditions of soil, manuring and climate, they left nothing to be desired, as all the samples had been cultivated under conditions as nearly identical as practicable and, moreover, were all of one and the same crop (1904). There is, however, one factor which cannot be supposed to be identical for all the samples, namely the stages of maturity at which they had been reaped. The results obtained in the preceding experiments have, however, shown how the chemical composition of the dry matter is affected by this factor. Therefore, although we shall have to count with differences caused by it, we shall nevertheless be able to obtain a reliable expression for the influence exerted by differences of species, variety and type.

For use in these researches I received from the Swedish Station at Svalöf 36 different barley samples, which I examined by the method described above (II, p. 244).

Table XXV (see p. 294—95) gives a synopsis of the results

arrived at. With the exception of water and dry matter, all the substance groups have been calculated in such a manner as to express the number of gr. of substance found in 1000 gr. of dry matter.

It will be seen from the percentages of water that on examination all the samples contained much the same amount of water. With regard to the figures relating to "gr. of dry matter in 10,000 corns", it may be observed that they may be considered as a direct expression for the corn size. It is true, we cannot take it for granted that all the 36 barley samples have had the same specific gravity; yet, on an inspection of Table XXV it is easily perceptible that the values found for water, nitrogenous substances and ash, consequently also for the other substances — mainly carbohydrates —, vary in our experiments within so narrow limits as to warrant the assumption that the specific gravity of the dry matter cannot have been affected to any appreciable degree by these variations. Besides, it is to be observed that none of the samples examined have contained proteoses in greater quantity than mere traces (even type sample XI does not, I believe, exceed the permissible amount), from which fact it may be inferred that none of the samples have been exposed to a beginning germination. In running over the numbers given in the table, it is all but astonishing that we meet with such small variations in each column, save in that of dry matter.

In order to solve the problem under notice on the basis of those many analytical details, it will be advisable to examine each type separately. To begin with, we shall then have to ascertain if within each type we meet with greater divergences in the composition of dry matter than can be accounted for by differences of degree of maturity and time of storage. A view in this direction may be had by considering first the maximum and minimum values within each type, and then the differences between these two values. In Table XXVI I have brought together the experimental results in this manner.

The lowermost two series in this table contain numbers indicating the greatest deviation found in each group of substances when one and the same barley sample is examined after being reaped yellow-ripe and then over-mature, and after these different samples have been subjected to 0 to 60 days' storage.

Analyses of "Hordeum distichum".

TA

For the undernoted particulars I am indebted to "Sveriges Utsädesförening at Svalöf"							
Variety	Type	Botanical characteristics	Barley-sort indigenous to	Name of improvement	Develop-ment	No. in book of Genealog.	% of water in the sample
<i>Nudans</i>	I	Concave base. Long-haired basal bristle. Glabrous nerves.	Scania	—	late	0126	12'65
			—	Princess-barley	—	0105	13'26
			Scania	—	early	0128	12'60
			The isle of Öland	—	med. early	0137	11'85
			The isle of Hven	—	late	0131	11'97
			—	Hannchen-barl.	—	0110	12'39
			East-Gothland	—	late	0134	12'10
			The isle of Gothl.	—	early	0138	11'88
			"	—	med. early	0141	11'99
	II	Concave base. Long-haired basal bristle Dentated nerves.	Chevalier from Scania	}	early	0211	12'30
			West-Gothland		—	0207	12'03
			The isle of Hven		—	0219	12'14
			Chevalier from Scania	}	med. early	0212	12'00
			The isle of Gothl.		—	0202	11'99
	III	Concave base. Short-haired basal bristle. Glabrous nerves.	Dalecarlia	—	very early	0332	11'90
			Comm. Chevalier	—	—	0304	11'90
			The isle of Hven	—	late	0327	12'01
			The isle of Gothl.	—	—	0302	12'01
	IV	Concave base. Short-haired basal bristle. Dentated nerves.	—	Chevalier II	—	0403	11'84
			Chevalier from Scania	}	rather late	0421	11'92
			—		Gute barley	0402	11'89
<i>Erectum</i>	V	Basal furrow. Long-haired basal bristle. Glabrous nerv.	—	Swan's neck brl.	early	0506	11'68
	VII	Basal furrow. Short-haired basal bristle. Glabrous nerves.	Diamond barley	—	early	0703	11'83
			—	—	med. early	0705	12'07
			—	Primusbarley	early	0706	12'34
			Goldthorpe	—	rather late	0707	12'33
			Diamond	—	early	0704	11'88
			Plumage, fr. Swed.	—	—	0702	12'05
	VIII	Basal furrow. Short-haired basal bristle. Dentated nerv.	Diamond	—	late	0803	12'15

Analyses of "Hordeum tetrastichum".

<i>Pallidum</i>	IX	Long-haired basal bristle. Glabrous nerves.	America	—	late	0901	12'39
	X	Long-haired basal bristle. Dentated nerves.	Crossing —	— Gigant. six-row.	med. early "	01005 01001	12'27 12'28
	XI	Short-haired basal bristle. Glabrous nerves.	Jakutsk	—	early	01109	12'14
	XII	Short-haired basal bristle. Dentated nerves.	— Dalecarlia "	Early six-rowed — —	— med. early "	01201 01232 01216	12'29 12'45 12'41

IV.

100 gr. of dry substance contain — gr. of Nitrogen in the form of									1000 gr. of dry substance contain		Sum of	
Albumin	II	Denuclein	Protease	Peptone	Ammonia-Amine-Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Protease and Peptone
5	0·81	0·20	0	0·27	0·80	2·93	15·60	18·53	24·60	75·9	1·66	0·47
5	0·51	0·22	0	0·14	0·88	2·80	15·48	18·28	24·55	74·5	1·56	0·36
5	0·44	0·33	0	0·15	0·77	2·59	15·14	17·73	24·89	74·8	1·34	0·48
5	0·65	0·34	0	0·15	0·78	2·57	14·95	17·52	24·35	80·1	1·30	0·49
6	0·73	0·27	0·07	0·19	0·81	2·73	14·25	16·98	26·04	85·2	1·39	0·53
2	0·67	0·27	0	0·12	0·82	2·70	14·08	16·78	24·63	77·2	1·49	0·39
6	0·50	0·21	0	0·21	0·79	2·37	14·38	16·75	25·92	66·6	1·16	0·42
9	0·42	0·29	0	0·16	0·79	2·45	13·57	16·02	24·50	66·6	1·21	0·45
5	0·47	0·31	0	0·14	0·78	2·45	12·73	15·18	27·08	75·9	1·22	0·45
8	0·64	0·31	0	0·21	0·71	2·65	16·57	19·22	26·88	82·9	1·42	0·52
0	0·48	0·32	0	0·18	0·74	2·72	15·80	18·52	26·37	83·7	1·48	0·50
3	0·80	0·20	0	0·15	0·68	2·46	15·37	17·83	24·95	68·2	1·43	0·35
1	0·67	0·25	0·07	0·18	0·74	2·52	15·28	17·80	25·96	78·7	1·28	0·50
0	0·46	0·19	0	0·12	0·74	2·31	14·54	16·85	24·79	71·1	1·26	0·31
6	0·50	0·34	0	0·16	0·86	2·72	16·89	19·61	26·53	96·9	1·36	0·50
5	0·61	0·27	0·07	0·19	0·77	2·76	16·27	19·03	24·10	89·7	1·46	0·53
7	0·64	0·26	0	0·15	0·86	2·68	16·08	18·76	23·06	80·3	1·41	0·41
8	0·58	0·22	0	0·24	0·79	2·81	14·65	17·46	23·41	74·6	1·56	0·46
7	0·67	0·35	0·07	0·12	0·90	2·78	15·99	18·77	24·82	82·1	1·34	0·54
4	0·71	0·26	0·07	0·19	0·83	2·70	15·78	18·48	26·36	82·8	1·35	0·52
4	0·61	0·28	0·08	0·20	0·64	2·45	12·91	15·36	27·94	79·8	1·25	0·56
5	0·86	0·32	0·07	0·11	0·82	2·73	14·85	17·58	26·10	79·6	1·41	0·50
0	0·49	0·21	0	0·23	1·02	3·15	15·51	18·66	25·19	85·4	1·69	0·44
6	0·54	0·27	0	0·27	0·80	2·74	15·87	18·61	22·29	76·2	1·40	0·54
7	0·35	0·17	0·07	0·17	0·89	2·72	14·78	17·50	23·88	84·5	1·42	0·41
9	0·33	0·26	0·05	0·26	0·88	2·67	14·01	16·68	23·72	77·2	1·22	0·57
4	0·52	0·26	0	0·19	0·82	2·43	14·06	16·49	23·42	77·8	1·16	0·45
0	0·22	0·24	0	0·18	0·78	2·39	13·55	15·94	24·73	80·6	1·12	0·49
7	0·41	0·19	0·05	0·22	0·83	3·07	16·25	19·32	23·99	70·0	1·78	0·46
0	0·30	0·27	0	0·17	0·96	2·62	15·84	18·46	23·84	73·6	1·22	0·44
0	0·38	0·27	0	0·21	0·86	2·75	16·21	18·96	25·58	74·2	1·41	0·48
0	0·48	0·21	0	0·17	0·77	2·56	14·68	17·24	24·47	74·8	1·41	0·38
0	0·35	0·35	0·13	0·13	1·04	2·74	20·10	22·84	26·28	85·7	1·00	0·01
0	0·36	0·24	0·06	0·18	0·81	2·46	17·37	19·83	24·09	76·2	1·17	0·48
0	0·38	0·21	0	0·28	0·97	2·77	14·93	17·70	24·44	101·7	1·31	0·40
0	0·36	0·36	0·07	0·20	0·96	2·77	14·84	17·61	25·70	95·9	1·18	0·63

Species and Variety of barley	Type	Number of sam- ples examined		Gr. of dry substan- ce in 10,000 corn	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of										1000 gr. of dry subst. contain		Sum of					
					Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine- Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid 2 cc. n. Na OH	Albumins I and II		Denuclein Proteose and Peptone				
					I	II																
Hordeum distichum	I	9	Maximum	417.5	1.05	0.81	0.34	0.07	0.27	0.88	2.93	15.60	18.53	27.08	85.2	1.66	0.53					
			Minimum	359.7	0.65	0.42	0.20	0	0.12	0.77	2.37	12.73	15.18	24.35	66.6	1.16	0.36					
		Difference	57.8	0.40	0.39	0.14	0.07	0.15	0.11	0.56	2.87	3.35	2.73	18.6	0.50	0.17						
	II	5	Maximum	444.9	1.00	0.80	0.32	0.07	0.21	0.74	2.72	16.57	19.22	26.88	83.7	1.48	0.52					
			Minimum	398.8	0.61	0.46	0.19	0	0.12	0.68	2.31	14.54	16.85	24.79	68.2	1.26	0.31					
		Difference	46.1	0.39	0.34	0.13	0.07	0.09	0.06	0.41	2.03	2.37	2.09	15.5	0.22	0.21						
	III	4	Maximum	417.0	0.98	0.64	0.34	0.07	0.24	0.86	2.81	16.89	19.61	26.53	96.9	1.56	0.53					
			Minimum	381.9	0.77	0.50	0.22	0	0.15	0.77	2.68	14.65	17.46	23.06	74.6	1.36	0.41					
		Difference	35.1	0.21	0.14	0.12	0.07	0.09	0.09	0.13	2.24	2.15	3.47	22.3	0.20	0.12						
	IV	3	Maximum	422.6	0.67	0.71	0.35	0.08	0.20	0.90	2.78	15.99	18.77	27.94	82.8	1.35	0.56					
			Minimum	391.2	0.64	0.61	0.26	0.07	0.12	0.64	2.45	12.91	15.36	24.82	79.8	1.25	0.52					
		Difference	31.4	0.03	0.10	0.09	0.01	0.08	0.26	0.33	3.08	3.41	3.12	3.0	0.10	0.04						
erectum	VII	6	Maximum	459.4	1.20	0.54	0.27	0.07	0.27	1.02	3.15	15.87	18.66	25.19	85.4	1.69	0.57					
			Minimum	408.3	0.64	0.22	0.17	0	0.17	0.78	2.39	13.55	15.94	22.29	76.2	1.12	0.41					
	Difference	51.1	0.56	0.32	0.10	0.07	0.10	0.24	0.76	2.32	2.72	2.90	9.2	0.57	0.16							
Hordeum tetrastichum	X	2	Maximum	291.2	1.03	0.48	0.27	0	0.21	0.86	2.75	16.21	18.96	25.58	74.8	1.41	0.48					
			Minimum	288.9	0.93	0.38	0.21	0	0.17	0.77	2.56	14.68	17.24	24.47	74.2	1.41	0.38					
		Difference	2.3	0.10	0.10	0.06	0	0.04	0.09	0.19	1.53	1.72	1.11	0.6	0	0.10						
	XII	3	Maximum	333.3	0.93	0.38	0.36	0.07	0.28	0.97	2.77	17.37	19.83	25.76	101.7	1.31	0.63					
			Minimum	289.2	0.81	0.36	0.21	0	0.18	0.81	2.46	14.84	17.61	24.09	76.2	1.17	0.48					
		Difference	44.1	0.12	0.02	0.15	0.07	0.10	0.16	0.31	2.53	2.22	1.67	25.5	0.14	0.15						
Analytical errors				3.7	0.09										0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09	
Greatest difference found	from yellow-ripeness to over-maturity from 0 to 60 days' storage	63.7	0.72	0.26	0.09	0.09	0.14	0.17	0.56	4.27	3.71	1.3	45.1	0.52	0.14							
		19.1	0.70	0.55	0.30	0.11	0.31	0.48	0.93	3.04	2.80	1.5	27.7	0.44	0.11							

These numbers are deduced from Table XXII, p. 288, and Table XXIII, p. 290, respectively. They cannot, of course, be taken as a standard in the case under consideration; but at any rate they may help us to form an approximate estimate of the fluctuations with which we have to count if we wish to know whether a group of barley samples — of one type — may be supposed to have a constant composition of dry matter or not.

On comparing the differential numbers stated in Table XXVI with the last two series of numbers, we now arrive at the following conclusion: — The differences in the composition of dry matter within each type are, in each of the cases under notice, comparatively so small as to be attributable to fluctuations in the degree of ripeness and time of storage of the individual samples.

That the duration of storage has not been the same, appears from the fact that the examination of the materials occupied three months.

Accordingly, we shall be safe in maintaining that the composition of dry matter in the individual samples within each type exhibit a sufficient uniformity for us to be able to make use of the materials for a calculation of mean values.

Table XXVII gives a synopsis of these relating to each type of *Hordeum distichum*. Besides, it gives the maximum and minimum values of the type means within the same variety, together with the differences between these.

A consideration of the differential numbers within the variety “*nutans*” leads to the conclusion that the difference in the chemical composition of dry matter between the various types of this variety is so small that any influence exerted by the barley type in itself on the chemical composition of the dry matter is quite out of the question. A similar conclusion may without doubt be drawn with regard to the various types of the variety “*erectum*”. In this case, however, it is to be observed that we have no real average values for the types V and VIII, since these are represented by only one sample each. Consequently, in judging the differential numbers relating to *Hordeum distichum erectum*, we must make some allowance for the influence exerted on the composition of dry matter by a difference of maturity and duration of storage — see Table XXVI, the lowermost two series.

TABLE XXVII.

Means of the samples of «Hordeum distichum»			Number of samples examined	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain --- gr. of nitrogen in the form of							1000 gr. of dry substance contain		Sum of		
Variety	Type	I			II	Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Proteose and Peptone
nutans	I II III IV	9 5 4 3	395.9 423.5 400.0 405.7	0.79 0.76 0.87 0.65	0.58 0.61 0.58 0.66	0.27 0.25 0.27 0.30	0.01 0.01 0.02 0.07	0.17 0.17 0.19 0.17	0.80 0.72 0.82 0.79	2.62 2.52 2.75 2.64	14.46 15.52 15.97 14.90	17.08 18.04 18.72 17.54	25.17 25.79 24.28 26.37	75.2 76.9 85.4 81.6	1.37 1.37 1.45 1.31	0.45 0.43 0.48 0.54
	Maximum Minimum		423.5 395.9	0.87 0.65	0.66 0.58	0.30 0.25	0.07 0.01	0.19 0.17	0.82 0.72	2.75 2.52	15.97 14.46	18.72 17.08	26.37 24.28	85.4 75.2	1.45 1.31	0.54 0.43
		Difference		27.6	0.22	0.08	0.05	0.06	0.02	0.10	0.23	1.51	1.64	2.09	10.2	0.14
	Means of all samples			404.6	0.78	0.60	0.27	0.02	0.17	0.79	2.63	15.06	17.69	25.32	78.5	1.38
erectum	V VII VIII	1 6 1	439.8 434.7 417.2	0.55 0.93 1.37	0.86 0.41 0.41	0.32 0.24 0.19	0.07 0.03 0.05	0.11 0.22 0.22	0.82 0.87 0.83	2.73 2.70 3.07	14.85 14.61 16.25	17.58 17.31 19.32	26.10 23.87 23.99	79.6 80.3 70.0	1.41 1.34 1.78	0.50 0.49 0.46
	Maximum Minimum		439.8 417.2	1.37 0.55	0.86 0.41	0.32 0.19	0.07 0.03	0.22 0.11	0.87 0.82	3.07 2.70	16.25 14.61	19.32 17.31	26.10 23.87	80.3 70.0	1.78 1.34	0.50 0.46
		Difference		22.6	0.82	0.45	0.13	0.04	0.11	0.05	0.37	1.64	2.01	2.23	10.3	0.44
Means of all samples			433.1	0.94	0.47	0.24	0.04	0.20	0.85	2.74	14.86	17.60	24.17	78.9	1.41	0.48
Analytical errors			3.7			0.09			0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8		0.09

As to "*Hordeum tetrastichum*", it cannot be ascertained whether the composition of dry matter is affected by differences of type, because of the insufficiency of the experimental materials at our disposal. A consideration of the experimental results recorded in the lowermost part of Table XXV will, however, lead to much the same conclusion as above, namely that also in the case of the variety *Hordeum tetrastichum pallidum* the composition of dry matter does not seem to be affected by differences of type. Moreover, it appears to me that we have no reason for assuming differences of type to be without any influence on the composition of dry matter within one variety whilst within another the exact reverse is the case.

As regards the question as to the influence of differences of variety on the composition of dry matter, reference must again be made to Table XXVII, p. 298. This table in its upper part gives the mean values for all the samples of *Hordeum distichum nutans*, and in its lower part those for all the samples of *Hordeum distichum erectum*. On comparing these two series of average values, it will be noticed that the number expressing the amount of dry matter in "*erectum*" is greater by 28.5 gr. than the corresponding number relating to "*nutans*", and also that the numbers for albumins I and II are 0.16 gr. greater and 0.13 gr. smaller respectively in the case of "*erectum*" than in that of "*nutans*". On the contrary, with regard to all the other substances or groups of substances, the divergences are throughout lower than the analytical errors. The above divergences relating to the albumins I and II, whilst certainly greater than the analytical errors, yet appear to me so small that they can hardly be taken as proof of an influence of variety, the more so because the aggregate amount of the two albumins is the same in "*erectum*" and "*nutans*". On the other hand, the average values show that "*erectum*" is generally a little more large-grained than "*nutans*".

Thus, the results force the conclusion on my mind that the variety of barley does not in itself influence the chemical composition of dry matter, as far as the various groups of nitrogenous matters, mineral constituents and water-soluble acid combinations are concerned.

We go on to investigate the influence of the species on the composition of dry matter.

The accompanying Table XXVIII brings together the mean values for all the samples of the species "Hordeum distichum" and "Hordeum tetrastichum". On considering the differences between these two series, we are led to exactly the same conclusion with respect to the influence of the species on the composition of dry matter as stated above in regard to the influence of the variety.

Thus, these researches and considerations lead to the surprising result that the chemical composition of the dry matter of barley is not affected by differences of species, variety or type, as far as the various groups of nitrogenous substances, ash and water-soluble acid combinations are concerned.

That the size of the corns is influenced in a greater or less degree by differences of species and variety, is a well-known fact¹⁾.

¹⁾ The corns of tetrastichum are smaller than those of distichum.

TABLE XXVIII.

Mean values of the samples	Gr. of dry sub- stance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry substance contain		Sum of		Number of samples	
		Albumin		Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia Amine- Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II		Denucleïn Proteose and Peptone
		I	II												
Hordeum distichum . . .	416.7	0.82	0.56	0.26	0.03	0.18	0.80	2.65	15.01	17.66	25.00	78.6	1.38	0.47	29
Hordeum tetrastichum .	290.4	0.88	0.37	0.27	0.04	0.19	0.91	2.66	16.29	18.95	24.92	83.2	1.25	0.50	7
Difference .	126.3	0.06	0.19	0.01	0.01	0.01	0.11	0.01	1.28	1.29	0.08	4.6	0.13	0.03	
Analytical errors	3.7	0.09						0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09	

Accordingly, if we meet with barley crops differing, as far as the above substance-groups are concerned, in respect of dry matter composition, the reason of such a difference must be supposed to lie in the circumstance that the samples have been grown under different conditions regarding the chemical and physical nature of the soil, the manurial treatment and the climatic peculiarities of their native places. That the chemical composition of barley dry matter is seriously affected by such conditions and probably various other factors, has been clearly established by other observers¹). But a knowledge of their influence on composition of the dry matter with regard to the various groups of proteine substances was still lacking, and with a view to elucidate this important question I set on foot a series of analyses of a certain number of barley samples originating from very different habitats²). The results of these investigations are tabulated on the next page. In judging the value of these results with regard to the question here before us, it must, however, be borne in mind that the analyses refer to common commercial samples. We have therefore to count with the possibility that the various samples may have been harvested at different stages of maturity and stored during different lengths of time. This being the case, it follows that here again we must take into consideration the variations which a difference in the degree of maturity and duration of storage may produce in the chemical composition of the dry matter. The values expressing the influence of these two factors are given in the lowermost two series of Table XXIX. The latter also sets forth the maximum and

¹) J. König: *Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel*. 4. Aufl., Bd. I, pp. 481—519. — On the pp. 491 to 508 are recorded a very large number of analyses of malting barleys from all parts of the world, which show that the dry matter composition, as far as total nitrogen and mineral constituents are concerned, is always more or less influenced by the native place. PP. 509—11 give a certain number of analyses of barleys grown in varying manuring experiments; from these it appears that certain manurial substances are able to modify the dry matter composition both with regard to total nitrogen and ash. Finally, a table on p. 516 shows how the percentage of nitrogen is affected by the date of sowing. —

As to the influence of manurial substances, I may also refer to a very interesting and instructive memoir by J. Stoklasa: *Zeitschr. f. das gesammte Brauw.* **28**, 502 (1905).

²) All the samples were common field, or commercial, barleys.

TABLE XXIX.

Sort of barley	Habitat	Year	% of water in the sample	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry substance contain		Sum of		
					Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Proteose and Peptone
I	II																
Goldthorpe	Denmark	1901	15.34	390.3	1.02	0.52	0.26	0	0.19	0.77	2.76	12.04	14.80	26.7	73.5	1.54	0.45
Unknown	"	1901	15.05	358.7	0.89	0.71	0.32	0	0.13	0.89	2.94	14.46	17.40	26.1	82.1	1.60	0.45
"	"	1902	19.63	393.7	0.95	0.47	0.41	0	0.13	0.81	2.77	13.13	15.90	—	77.4	1.42	0.54
Hanna	Moravia	1901	13.74	377.8	0.95	0.69	0.38	0	0.12	0.95	3.09	15.41	18.50	25.9	76.6	1.64	0.50
"	"	1901	13.74	388.2	1.01	0.44	0.44	0	0.07	0.94	2.90	12.42	15.32	28.6	81.1	1.45	0.51
"	"	1902	13.51	390.1	1.01	0.50	0.32	0	0.19	0.90	2.92	14.58	17.50	26.5	83.3	1.51	0.51
Unknown	Asia Minor	1901	11.44	408.3	0.92	0.31	0.37	0	0.12	0.61	2.33	13.97	16.30	23.7	65.8	1.23	0.49
"	California	1901	11.91	421.1	0.56	0.56	0.30	0	0.13	0.93	2.48	11.72	14.20	31.0	79.5	1.12	0.43
"	Egypt	1901	11.60	288.5	0.93	0.36	0.37	0	0	1.24	2.90	13.50	16.40	39.1	35.2	1.29	0.37
Maximum	Minimum			421.1	1.02	0.71	0.44	0	0.19	1.24	3.09	15.41	18.50	39.1	83.3	1.64	0.51
				288.5	0.56	0.31	0.26	0	0	0.61	2.33	11.72	14.20	23.7	35.2	1.12	0.37
Difference				132.6	0.46	0.40	0.18	0	0.19	0.63	0.76	3.69	4.30	15.4	48.1	0.52	0.14
Greatest difference found	from yellow-ripen. to over-maturity			63.7	0.72	0.26	0.09	0.09	0.14	0.17	0.56	4.27	3.71	1.3	45.1	0.52	0.14
	from 0 to 60 days' } storage			19.1	0.70	0.55	0.30	0.11	0.31	0.48	0.93	3.04	2.80	1.5	27.7	0.44	0.11

minimum values for the whole of the experimental material, together with the differences between the two series of numbers.

On comparing the differential numbers with the last two series, it will be noticed that, after all, it is only in the case of mineral constituents (ash) that we meet with a really considerable and indisputable variation. Total nitrogen and amine-amid nitrogen also exhibit some variation, whereas in the case of all the other groups of constituents the fluctuations are comparatively so small as to be attributable exclusively to differences in degree of maturity and duration of storage. Although the materials submitted to the examination may not have been sufficiently copious to give a conclusive answer to the question, yet I believe I am safe in maintaining that the cultural¹⁾ condition of the soil and the climatic conditions have influence on the ash content of the barley dry matter and, to a certain extent, also on the amount of total nitrogen and amine-amid nitrogen, whereas the other groups of nitrogenous constituents are affected in a less degree by these factors than by such as the degree of maturity and duration of storage.

8. Concluding Remarks.

Before leaving this subject, I cannot forbear to make a short remark which is forced upon my mind by one of the rather surprising results (so they seem to me at least) which the present research has brought to light.

I allude to the statement made on p. 300, that differences of species, variety and type do not *per se* affect the chemical composition of the dry matter of barley, as far as the various groups of nitrogenous substances, mineral constituents and water-soluble acid combinations are concerned.

There is evidently some reason to presume that this result might lead to the view that endeavours towards the improvement of barley are in reality established on a less solid foundation than was hitherto supposed. I believe, however, that on considering the question in all its bearings we shall arrive at a directly opposed conclusion.

¹⁾ I use this expression to denote not solely the natural condition of the soil, but also the manuring cultivation.

If we imagine that differences of species, variety and type exerted a direct influence upon the chemical composition of the dry matter, whilst at the same time we know positively that other factors (such as conditions of soil, manuring, *etc.*) come also into play, it follows that, practically, all endeavours at improvement must ultimately give a very precarious result. Let us suppose for example that by improvement we succeed in producing a culture which, under the conditions of soil, manurial treatment *etc.*, obtaining in the place concerned, gives the result wished for with respect to the composition of dry matter. When this culture is subjected to practical cultivation and brought under the action of different conditions of soil, manuring *etc.*, it is obvious that the ultimate crop is likely to be of a different condition from that wished for and aimed at, because the result must necessarily be determined in degree by the action of the altered conditions of soil; manuring *etc.* Under such circumstances we cannot tell whether the result aimed at can be most easily obtained by trying another improvement culture or by modifying the conditions of cultivation (nutritive matters of the soil, *etc.*). In this way it would be rather a difficult matter to attain the object.

If, on the contrary, we abide by the result arrived at by the present investigations, it appears that the principle upon which the endeavours toward improvement of barley have been hitherto conducted can only settle one part of the matter, namely the preparation of a growth decidedly the best suited to local requirements (conditions of soil, manuring *etc.*). But in regard to the chemical composition of the dry matter, it has now been established that the endeavours must be governed by two fundamental principles, an internal and an external one, the former being without any influence upon the chemical composition of dry matter, whilst the latter is, on the contrary, decisive in this respect.

Accordingly, any work having for its object the improvement of barley, must consist of two parts, which are not interdependent, namely: —

(1) The purely botanical part, the immediate object of which must be to provide pure species, varieties and types, and to test the practical value and constancy of such pure cultures — in short, to make a selection.

(2) That coming within the range of agricultural chemistry and having for its object to test the behaviour of the selected cultures in regard to the action of the various external factors.

It is only when these two parts of the work can be made to concur towards the attainment of the common end aimed at that the efforts can be expected to yield practically applicable results, yielding a proper remuneration for the great amount of labour bestowed upon this task.

Professor Hjalmar Nilsson, the scientific director of the Swedish Seed-corn Association at Svalöf, is working just now upon a plan nearly coinciding with the one propounded above. The very extensive and thorough-going labours of this institution stand a fair chance of giving highly valuable results also in future.

9. Main Results.

These may be summed up as follows: —

(1). Owing to the comparatively great error (about 1 % of proteine) with which we have to count in estimating the percentage of proteine matter in a barley crop or lot of barley, I consider it misleading to use this quantity (% of proteine) as a factor determining the quality of malting barley. Moreover, the foundation underlying the valuation by amount of nitrogen is in some measure sapped by the circumstance that the modes of working used in malting, brewing etc., in different localities are very different (*vide* p. 255).

(2). Barleys which have had a growth and ripening period of short duration are much more liable to suffer a loss of dry matter by over-ripening than such barleys as have had a long developmental period. Besides, it appears that the corn size depends to a certain extent upon the duration of that period, of course within the same species and variety (*vide* p. 271).

(3). Barley has acquired full maturity when the conversion of soluble into insoluble carbohydrates and soluble into insoluble proteids has ceased or reached its maximum (*vide* p. 273).

(4). When the development of the barley grain — from green-ripeness to yellow-ripeness — takes place during a normal period of development, there exists an absolute equilibrium between the quantity of nitrogen received in a given time and the nitrogen quantity converted in the same time into insoluble

combinations; whereas the transformation of soluble nitrogen combinations into insoluble ones in a short period of development takes place at a quicker rate than does the intake of nitrogen, the reverse being the case in a long period of development (*vide* p. 275).

(5). The condensation of amine-amid combinations into soluble proteids takes place with greater intensity during a short than during a long period of development, and this process is very nearly in an equilibrium with the further intake of nitrogen as soon as the stage of yellow-ripeness has been reached (*vide* p. 278).

(6). The proteoses cannot be supposed to act as intermediate terms in the condensation of amine-amid combinations into protein individuals of a higher order, but are exclusively to be regarded as hydrolytic cleavage products of proteids of a higher order (*vide* p. 280).

(7). An appreciable amount of proteose in a barley crop must always be considered as indicative of rather unfavourable harvest conditions (*vide* p. 281).

(8). A loss of dry matter (respiration loss) is not likely to take place during the storage of barley, provided the storage takes place under suitable conditions, and providing also the barley sample has reached a suitable degree of maturity before being reaped (*vide* pp. 283 and 291).

(9). The ripening barley grain is tending toward a state of equilibrium in respect of its nitrogenous constituents; when, on the reaping of the barley, this state has been reached, it is not disturbed during storage, except in the case of albumins I and II (*vide* pp. 284 and 289).

(10). The amount of albumin I in proportion to dry matter decreases in a greater or less degree according as the barley is allowed to attain a greater and greater degree of maturity, whereas the quantities of albumin II, insoluble nitrogen, total nitrogen and water-soluble acid combinations increase more or less. The amount of water-soluble nitrogenous combinations is also subject to considerable fluctuations, which, however, are sometimes positive, sometimes negative. Denucleïn, proteose (= o), peptone, ammonia amine-amid and mineral constituents — in each individual barley sample — show a constant weight in the dry matter, as soon as the corn has reached its full

development; consequently, the quantities of these substances remain constant during the real maturation process (*vide* p. 286—89).

(11). If reaped at an early stage, barley is less rich in nitrogen than it is if reaped later (*vide* p. 289).

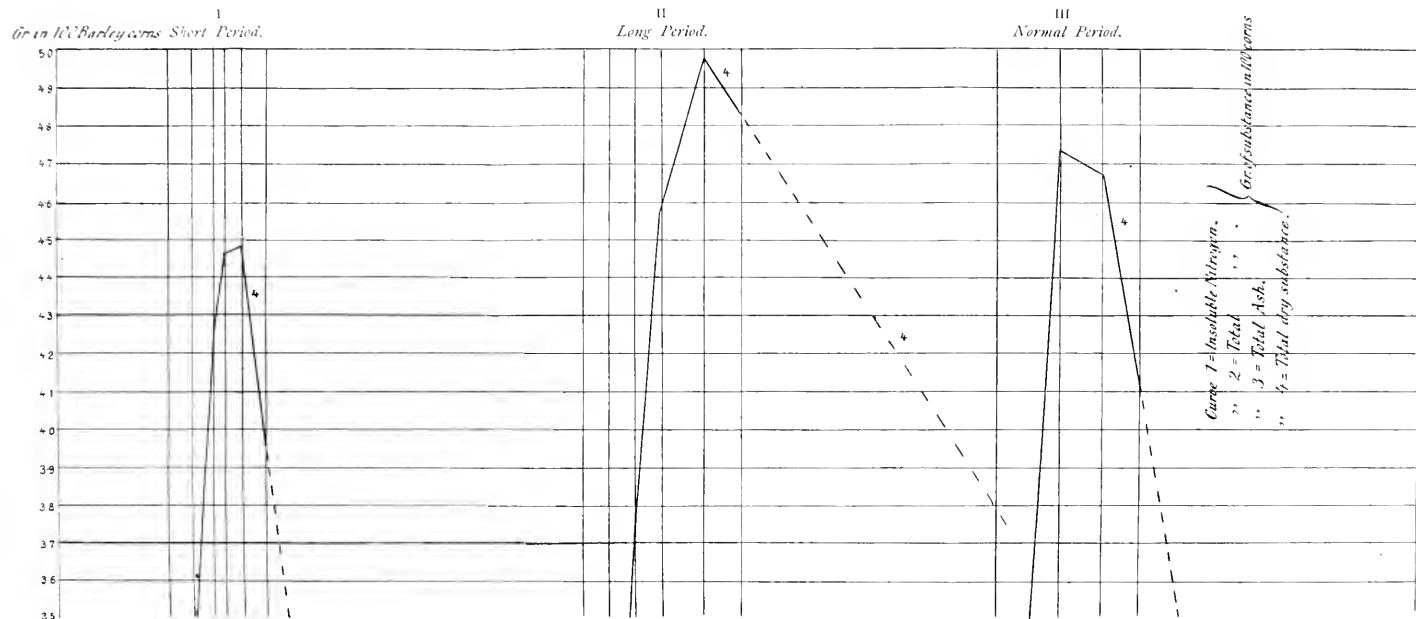
(12). The chemical composition of dry matter in respect of the various groups of nitrogenous substances, mineral constituents and water-soluble acid combinations — is, properly speaking, not dependent on the species, variety or type of barley (*vide* p. 300).

(13). The cultural condition of the soil, as also climatic conditions, exert some influence on the amount of mineral constituents in barley dry matter, and to a certain extent also upon the amounts of total nitrogen and amine-amid nitrogen, whereas with regard to the other groups of nitrogenous substances, the influence of these factors is less marked than the degree of maturity and time of storage (*vide* p. 303).

In conclusion, I have to acknowledge my indebtedness, and to offer my hearty thanks, to the Institutions and Gentlemen who most obligingly enabled me to procure the requisite experimental materials and to set on foot the necessary investigations. I also feel impelled to tender my sincere thanks to Professor E. Chr. Hansen and Dr. S. P. L. Sørensen for valuable advice and assistance in elaborating the present paper.

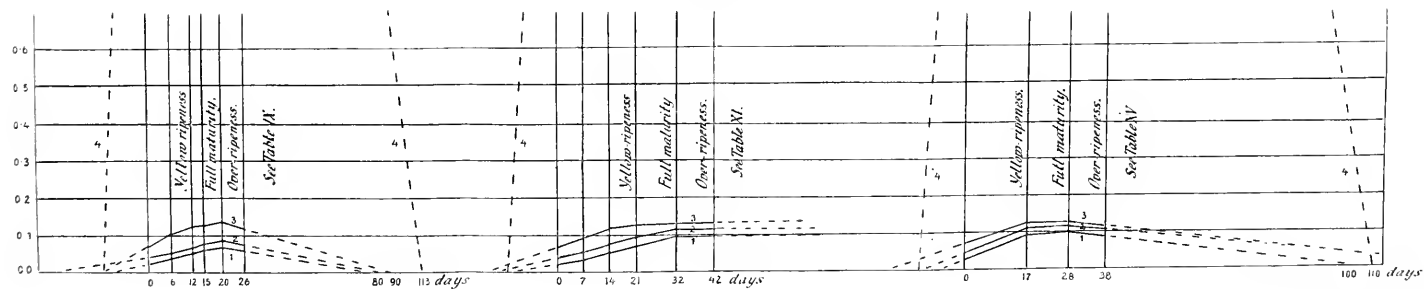
Copenhagen, November 1905.

CURVE TABLE II. BARLEY RIPENING EXPERIMENT.



0.7.

0.5 Gr. of substance in 100 grains







TP Carlsberg Laboratoriet,
500 Copenhagen
C35 Comptes rendus des travaux
v.5-6

~~██████████~~
~~██████████~~
~~██████████~~

Engineering

PLEASE DO NOT REMOVE
CARDS OR SLIPS FROM THIS POCKET

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

ENGIN STORAGE

